Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. A. M. Kellerer

METHYLGRUPPEN - TURNOVER IN DEN HISTONEN DER RATTENORGANE LEBER, MILZ, NIEREN UND DARM

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Norbert Knöck
aus Krefeld-Uerdingen

Würzburg, den 25. Mai 1981

Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. A. M. Kellerer

METHYLGRUPPEN - TURNOVER IN DEN HISTONEN DER RATTENORGANE LEBER, MILZ, NIEREN UND DARM

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Norbert Knöck
aus Krefeld-Uerdingen

Würzburg, den 25. Mai 1981

Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Hempel

Korreferent: Prof. Dr. med. U. Trendelenburg

Dekan: Prof. Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 27.7.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

M E I N E R F R A U

U N D

M E I N E N E L T E R N

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543519_0010

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Histonbiosynthese	1
1.2	Modifikationen am Histonmolekül und Histonfunktion	1
1.2.1	Histonacetylierung	2
1.2.2	Histonphosphorylierung	2
1.2.3	Histonmethylierung	3
1.3	Histon-DNA-Interaktion	4
1.4	Ziel der Arbeit	5
2.	MATERIALIEN UND METHODEN	7
2.1	MATERIAL	7
2.1.1	Radioaktive Verbindungen	7
2.1.2	Inaktive Verbindungen	11
2.2	METHODEN	12
2.2.1	Biologische Verfahren	12
2.2.1.1	Tierversuche	12
2.2.2	Analytische Verfahren	15
2.2.2.1	Isolierung des Gesamthistons aus den Organen	
2.2.2.2	Proteinbestimmung des Gesamthistons	18
2.2.2.3	Gelelektrophoretische Auftrennung und Reinigung von Proteinen	20
2.2.2.4	Bestimmung des ^{3}H-Tryptophangehalts von Histonen durch Verbrennung von Gelen	22

		Seite
2.2.2.5	Flüssigkeits-Chromatographie von Pyridoxyl-Aminosäuren zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität von ^{3}H-Methionin und ^{3}H-Leucin im Serum	23
2.2.2.6	Elution von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen	29
2.2.2.7	Elution von Histonen aus Polyacrylamid-Gelen	36
2.2.2.8	Bestimmung der spezifischen Radioaktivität des Methionin, Leucin und der basischen Methyllysine der einzelnen Histonfraktionen	38
2.2.2.9	Probleme bei der Auswertung der Aminosäurenanalysen zur Mengenbestimmung von Methionin, Leucin und der basischen Methyllysine	41
2.2.2.10	Berechnung der Histonneubildungsraten und des Methylgruppenumsatzes	47
3.	ERGEBNISSE	51
3.1	Histonnachweis	51
3.2	Spezifische Radioaktivität der Vorläufer der Histonbiosynthese	51
3.3	Histonneubildung	55
3.3.1	Menge und spezifische Radioaktivität der Aminosäuren Methionin und Leucin	56
3.4	Methylierungsraten der N^{ε}-methylierten Lysine	65

		Seite
4.	DISKUSSION	72
4.1	Histon-Turnover in den Rattenorganen Leber, Milz, Nieren und Darm	72
4.1.1	Beurteilung der Methoden	72
4.1.2	Histon-'Nettobiosynthese' in den untersuchten Rattenorganen	74
4.2	Methylgruppen-Turnover in den Histonen der Rattenorgane Leber, Milz, Nieren und Darm	75
4.3	Funktionelle Bedeutung der Histonmethylierung	76
5.	ZUSAMMENFASSUNG	79
6.	LITERATURVERZEICHNIS	82
7.	ABKÜRZUNGEN	89

1. E I N L E I T U N G

1.1 Histonbiosynthese

Histone sind basische Kernproteine, die im Zellkern eng mit der DNA verbunden sind. Die fünf Hauptfraktionen, die mittels Gelelektrophorese gefunden werden können, unterscheiden sich von Spezies zu Spezies nur sehr wenig (1). Ihre Aminosäuresequenz, die von den meisten Fraktionen bekannt ist (15), hat sich im Laufe der Evolution kaum verändert. So unterscheidet sich z.B. das Histon H4 aus Erbsenkeimlingen von dem aus Kalbsthymus nur in 2 von insgesamt 102 Aminosäuren (16).
Nach heutiger Auffassung läuft die Histonbiosynthese im Cytoplasma ab (27) und zwar an kleinen Polysomen mit 8-10 S RNA als Messenger (8). Die höchste Syntheserate findet sich, wenn auch die DNA-synthese ihren Höhepunkt erreicht hat, also in der S-phase des Zellzyklus (27). Dieser Zusammenhang zwischen Histonsynthese und DNA-synthese wurde durch Suppressionsversuche bestätigt (35). So läßt sich durch Suppression der DNA-synthese auch die Histonsynthese unterdrücken.

1.2 Modifikationen am Histonmolekül und Histonfunktion

Die Vorstellung über die Histonfunktion geht dahin, daß Histone, die durch ihre enge Nachbarschaft zur DNA geradezu zur Steuerung der DNA-aktivität prädestiniert sind, durch

bestimmte Modifikationen wie Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung in ihrer Struktur so verändert werden, daß auch im Chromatin Konformationsänderungen auftreten. Diese Konformationsänderungen beeinflussen jetzt wiederum die Zugänglichkeit von Nucleinsäure-Polymerasen zu bestimmten Genorten. Die Regulation der Histonmodifikationen selbst könnte durch Enzyme ausgeübt werden, die ihrerseits einer Steuerung durch weitere Effektoren, wie z.B. c-AMP im Falle von Histonkinasen, kontrolliert werden (45).

1.2.1 Histonacetylierung

Eine der ersten Histonmodifikationen, die bekannt wurde, war die Histonacetylierung (2). Heute unterscheidet man zwei Formen: einmal den Einbau von N-Acetylserin am N-terminalen Ende der Histone H1, H2A und H4, die stabil und für postsynthetische Histonmodifikationen ohne Bedeutung sind, und zum anderen die N^{ε}-Acetylierung von internen Lysinresten der argininreichen Histone H3 (Position 14 und 23) und H4 (Position 16). Die Acetylierung verändert die positive Gesamtladung des Moleküls, so daß sich die Interaktion zwischen Histon und negativ geladener DNA ändert, was zu schon angesprochenen Konformationsänderungen im Chromatin führt.

1.2.2 Histonphosphorylierung

Eine zweite Form der Histonmodifikation ist die Phosphory-

lierung. Vor allem die Histonfraktionen H1, H2A und H3 werden phosphoryliert. Man unterscheidet eine c-AMP-abhängige funktionelle Phosphorylierung, bei der z.B. im Schweinegehirn eine 3'-5'-c-AMP-abhängige Histonkinase in der Fraktion H2A das Serin 19 und im H2B Serin 14 und 36 phosphoryliert (43) und eine proliferative Phosphorylierung, die mit der Zellvermehrung zusammenhängt. Die Auswirkungen der funktionellen Phosphorylierung beeinflussen die Histon-DNA-Interaktion in ähnlicher Weise wie die Histonacetylierung.

1.2.3. Histonmethylierung

Zum Schluß die in dieser Arbeit untersuchte Methylierung von Lysinresten an der N^{ε}-Aminogruppe. Nach De Lange (17) enthalten nur die argininreichen Histonfraktionen H3 und H4 Methyllysinreste (Tabelle 1).

Tabelle 1 Vorkommen von Methionin und methylierten Lysinen in verschiedenen Histonfraktionen (De Lange (17))

Fraktion	Molekulargewicht	Methioninreste	Lysinreste	Methyllysinreste
H1	21000	Ø	?	Ø
H3	15324	2	13	2
H2B	13774	2	20	Ø
H2A	14500	Ø	14	Ø
H4	11282	1	11	1

So werden im Histon H3 aus Kalbsthymus von 13 Lysinresten 2 methyliert und zwar in den Positionen 9 und 27. Von den 11 Lysinresten des Histon H4 ist dagegen nur das Lysin in Position 20 methyliert. Die Methylierung erfolgt also an definierten Stellen im Molekül.
Der Zeitpunkt der Methylierung wird unterschiedlich angegeben. Bei synchronisierten HeLa-Zellen wurde eine Histonmethylierung während der G_2-phase des Zellzyklus und während der Mitose beschrieben (5), nach Teilhepatektomie von Ratten sprach man von einer Methylierung sowohl während (34), als auch deutlich nach der DNA- und Histonsynthese (47). Neuere Arbeiten zeigen, daß die Methylierung von Cytochrom c während der Proteinsynthese stattfindet (21).
Der Ort der Methylierung liegt im Gegensatz zur Histonbiosynthese im Zellkern an einer chromatingebundenen Methyltransferase (9,36). Methylgruppendonator ist S-Adenosylmethionin (13,37).

1.3 Histon-DNA-Interaktion

Bei der Untersuchung des räumlichen Zusammenhangs von Histonen zu der DNA fand man (14,30,31), daß ein 'Histonkern' , bestehend aus 8 Histonmolekülen umgeben war von ca. 200 DNA-Basenpaaren. Die stark basischen N-terminalen Anteile der Histone stehen dabei in Wechselwirkung mit der DNA (3), wogegen die C-terminalen Enden den Zusammenhang zwischen den einzelnen Histonen bilden.

Die Histonmodifikationen, wie Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung liegen im N-terminalen Anteil der Histonmoleküle, befinden sich also in enger Nachbarschaft zur DNA. Eine Änderung der Konformation des Histon-DNA-Komplexes ist deshalb bei Ein- oder Ausbau von zusätzlichen Gruppen, wie z.B. Methylgruppen, sehr leicht denkbar, vor allem dann, wenn der Ein- und Ausbau dieser zusätzlichen Gruppen schneller von statten geht als der Auf- und Abbau von Histonen. Zur Steuerung der Genaktivität kann die Methylierung also nur dann führen, wenn der Methylgruppen-Turnover größer als der Turnover der Histone ist.

1.4 Ziel der Arbeit

Viele Fragen zur Bedeutung der Histonmethylierung sind noch offen. Es gibt eine Reihe von Arbeiten zur Stabilität der N^{ε}-Methylgruppen (5,18,21,46), aber es ist umstritten, ob es einen Methylgruppen-Turnover unabhängig von der Histon-Neubildung gibt (5,10,11,18,19,29).

In dieser Arbeit wurde versucht:

a. auf Fragen zur Stabilität histongebundener Methylgruppen eine Antwort zu geben, und

b. diesem Ziel mit Hilfe neuerer gelelektrophoretischer Methoden näher zu kommen.

ad a: Damit der Histonmethylierung eine Regelfunktion bei der Aktivität von Genen zugeschrieben werden kann, muß die Stabilität des Histongerüsts größer sein als die der N^{ε}-Methylgruppen. Die meisten Untersuchungen in diese Richtung

wurde an proliferierenden Zellsystemen (5,10,18,34,46) durchgeführt. Dabei fand die Methylierung der Histone während der maximalen DNA-Synthese statt. Wenn das der Fall ist, kann die Methylierung von Histonen keine, wie man sich vorstellt, regulierende Funktion auf die Genaktivität haben. In dieser Arbeit wurde versucht die Stabilität der N^{ε}-Methylgruppen von Histonen in nicht proliferierenden Organen wie Leber und Niere, sowie in proliferierenden Organen wie Milz und Darm der Ratte zu untersuchen. Nach Dauerinfusion von L-Methionin(methyl-^{3}H) und DL-Leucin(4,5-$^{3}H_2$) wurden Histonbiosyntheseraten und Methylgruppenumsatz in den Histonen dieser Organe bestimmt.

ad b: Die Gelelektrophorese ist ein einfaches und wirkungsvolles Verfahren Histone in ihre Fraktionen aufzutrennen. Für weitere Analysen, insbesondere Aminosäureanalysen, waren die Histonfraktionen nach der Gelelektrophorese allerdings nicht mehr zu benutzen. In neueren Arbeiten zu diesem Thema wurden Proteine durch 'umgekehrte Elektrophorese' wieder aus den Gelen herausgelöst (7). Speziell diese Verfahren wurden in dieser Arbeit auf Histone angewandt und versucht zu verfeinern.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Radioaktive Verbindungen

a. L-Tryptophan(2,3-^{3}H)

L-Tryptophan(2,3-^{3}H) stammte von der Fa. New England Nuclear, Boston. Die spezifische Radioaktivität der verwendeten Charge betrug 17.9 Ci/mmol.
Die Reinheitskontrolle des Präparats erfolgte säulenchromatographisch unter folgenden Bedingungen:

Harz	:	DC 6A
Säulenvolumen	:	0.4 x 40 cm (Füllhöhe 30 cm)
Temperatur	:	71°C
Druck	:	35 Atm
Durchflußrate	:	21 ml/h

Als Puffer dienten 0.2 N Natriumcitratpuffer pH 4.25. Das Eluat wurde in 2-Minuten-Fraktionen mit dem Fraktionssammler aufgefangen, mit 15ml Szintillationsmedium versetzt und in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Tricarb, Modell 3380, Firma Hewlett-Packard) gemessen. Abb.1 zeigt die säulenchromatographische Reinheitskontrolle. Die radiochemische Reinheit betrug 79 %.

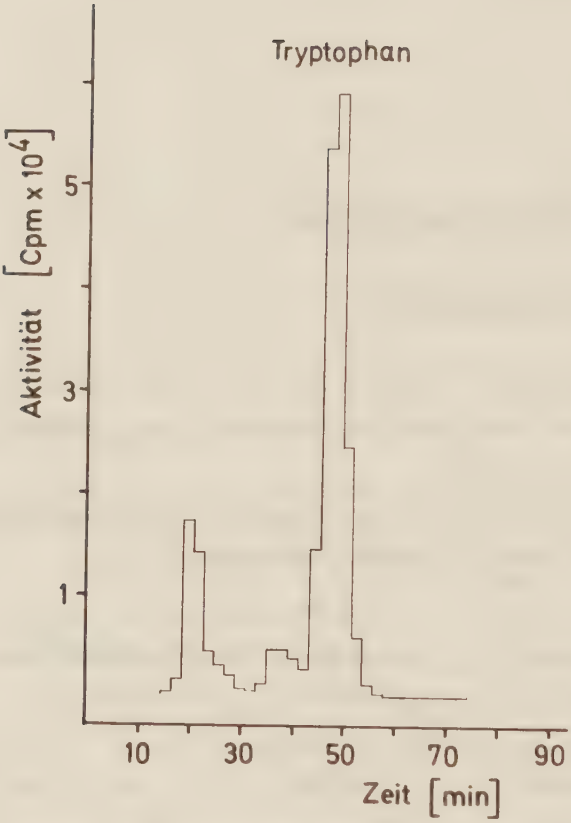

Abb. 1 Säulenchromatographische Kontrolle der radiochemischen Reinheit des L-Tryptophan(2,3-^{3}H)

b. L-Methionin(methyl-^3H) und DL-Leucin(4,5-$^3H_2$)

Die radioaktiven Aminosäuren L-Methionin(methyl-^3H) und DL-Leucin(4,5-$^3H_2$) wurden im eigenen Labor hergestellt. Die spezifische Aktivität betrug für L-Methionin(methyl-^3H) 0.87 Ci/mmol und für DL-Leucin(4,5-$^3H_2$) 15.0 Ci/mmol. Die Präparate wurden säulenchromatographisch unter folgenden Bedingungen von ihren Verunreinigungen getrennt:

Harz	:	DC 4A
Säulenvolumen	:	0.3 x 30 cm (Füllhöhe 29 cm)
Temperatur	:	74,5°C
Druck	:	30 Atm
Durchflußrate	:	13 ml/h

L-Methionin(methyl-^3H) wurde mit 0.2 N Natriumcitratpuffer pH 3.4 und DL-Leucin(4,5-$^3H_2$) mit 0.2 N Natriumcitratpuffer pH 4.0 eluiert. Im übrigen wurde wie beim Tryptophan verfahren.

Die in Abb. 2 und Abb. 3 abgebildeten Peaks für Methionin und Leucin wurden gesammelt und zur Injektion bei den Tierversuchen verwendet.

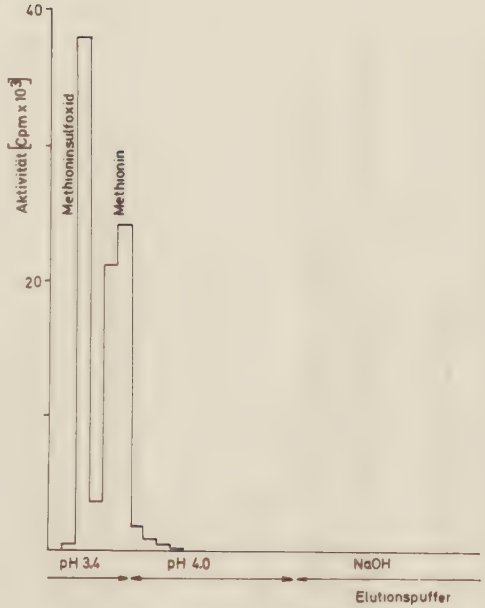

Abb. 2 Säulenchromatographische Reinigung von L-Methionin(methyl-^{3}H) Der fraktionierte Methioninpeak wurde zur Injektion verwendet.

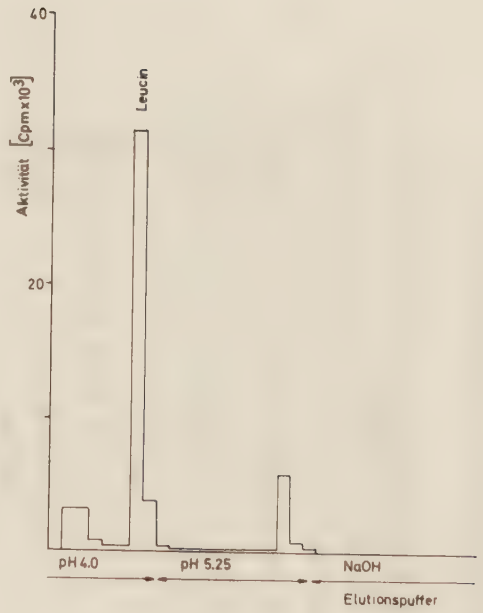

Abb. 3 Säulenchromatographische Reinigung von DL-Leucin(4,5-$^3H_2$). Der fraktionierte Leucinpeak wurde zur Injektion verwendet.

2.1.2 Inaktive Verbindungen

a. Substanzen für Polyacrylamid-Gele

Acrylamid

N,N-Methylenbisacrylamid (Bis)

N,N,N'-Tetramethyläthyldiamin (Temed)

alle drei Verbindungen 'reinst'

Fa. Serva Feinbiochemica GmbH und Co., Heidelberg

b. Ionenaustauscher

M 82 (sphärisches Harz), Fa. Beckman, München.

Durrum DC 4A (sphärisches Harz)

Durrum DC 6A (sphärisches Harz)

beide Fa. Pierce Eurochemie B.V., Rotterdam.

c. Szintillationsmedien

Toluol-Isopropanol-Medium

8.0 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO)

0.2 g 2,2'-p-Phenylenbis(5-phenyloxazol) (POPOP)

2000 ml Toluol

1200 ml Isopropanol

Tritonmedium

750 ml Toluol-Isopropanol-Medium (s.o)

250 ml Triton X-100

100 ml HCl

2.2 METHODEN

2.2.1 Biologische Verfahren

2.2.1.1 Tierversuche

a. Versuch mit L-Tryptophan(2,3-^{3}H)

- Versuchstiere

Es wurden zwei männliche, einjährige Lewis-Ratten mit einem Gewicht von 420 g und 356 g verwendet. Die Tiere wurden mit Altromin-Standardfutter ernährt und vor dem Versuch nicht vom Futter abgesetzt.

- Versuchsdurchführung

Je Tier wurden 0.42 mCi L-Tryptophan(2,3-^{3}H), gelöst in einem Äthanol-H_2O-Gemisch (1:1), intraperitoneal injiziert. Zwei Stunden danach wurden die Tiere mit Äther eingeschläfert und die Organe Leber, Milz, Nieren und der Dünndarm entnommen. Die Organe wurden sofort nach der Entnahme auf Trockeneis tiefgefroren. Zusätzlich erfolgte eine Blutentnahme zur Gewinnung von Serum aus dem Herzen.
Ziel des Versuchs war es nachzuweisen, daß Histone kein Tryptophan enthalten, und somit auch kein radioaktiv markiertes Tryptophan in Histone eingebaut wird (28).

b. Versuch mit L-Methionin(methyl-^3H) und DL-Leucin(4,5-$^3H_2$)

- Versuchstiere

Zu diesem Versuch wurden vier männliche Ratten vom Stamm Sprague Dawley benutzt. Ihr Gewicht lag zwischen 291 g und 366 g. Die Ernährung vor dem Versuch erfolgte mit Altromin-Standardfutter.
12 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren das Futter entzogen.

- Injektions- bzw. Infusionslösungen

Narkose: 0.1 ml Inaktin/60 g Körpergewicht intraperitoneal;
Spontanatmung;
Infusion: nach Bedarf: isotonische Kochsalzlösung;
Radioaktive Aminosäuren: Die radioaktiven Präparate L-Methionin(methyl-^3H) und DL-Leucin(4,5-$^3H_2$) waren in 0.2 N Citratpuffer gelöst, der durch Zugabe von festem Natriumbikarbonat auf ca. pH 7.0 eingestellt war.

- Versuchsanordnung

Die V. und A. femoralis einer Seite wurden freipräpariert und in jedes Gefäß eine feine Kanüle eingebracht, nachdem die Narkose mit Inaktin eingeleitet war. Die Kanülen wurden mit einem Liquemin-Kochsalz-Gemisch vorgespült.
Kreislaufkontrollen: Zur Blutdruckmessung diente die in die A. femoralis vorgeschobene Kanüle, die mit einem Quecksilbermanometer verbunden war. Zusätzlich wurde alle fünf Minuten ein EKG geschrieben und daraus die Herzfrequenz bestimmt.

Blutentnahmen: Zur Gewinnung von Serum wurden Blutentnahmen aus dem Plexus retrobulbaris durchgeführt. Bei einer durchschnittlichen Versuchszeit von 130 Minuten wurden jeweils 13 Proben von 0.2 - 0.3 ml Blut in Sarstedt-Röhrchen aufgefangen und sofort auf Eis gelagert.

Infusion: Die in der V. femoralis plazierte Kanüle diente während des Versuchs der Injektion bzw. Infusion der radioaktiven Aminosäuren. Zu Beginn wurde jedem Tier 0.5 ml des radioaktiven Präparats vorgespritzt und anschließend 2.5 ml mit Hilfe eines Perfusors kontinuierlich infundiert. Die insgesamt pro Tier verabreichte Aktivität betrug 21.6 mCi. Am Ende der Versuchszeit wurden die Tiere dekapitiert und die Organe Leber, Milz, Nieren und der Dünndarm entnommen und sofort auf Trockeneis tiefgefroren.

2.2.2 Analytische Verfahren

2.2.2.1 Isolierung des Gesamthistons aus den Organen

a. Kernisolierung

Die auf Trockeneis eingefrorenen Organe wurden in Anlehnung an eine Arbeit von Chauveau et al. (12) aufgearbeitet. Alle Schritte erfolgten bei 4°C im Eisbad oder in der Kältezentrifuge.

Nach dem Auftauen der Organe in einer Lösung aus 0.25 M Sucrose unter Zusatz von 1.5 mM $CaCl_2$ wurden sie mit einem Stößel durch ein Nylonsieb gedrückt und so zerkleinert. Der Organbrei wurde jetzt im 10-fachen Volumen der gleichen Lösung aufgenommen, mit dem Potter-Elvenhjem-Homogenisator suspendiert und der Kernpellet abzentrifugiert (1000 g, 4°C, 10 Minuten). Diese beiden Vorgänge wurden solange wiederholt, bis der Überstand klar war. Danach wurden die Kerne noch zwei Mal in 0.95 %-iger NaCl gewaschen und jeweils scharf abzentrifugiert (4000 g, 4°C, 10 Minuten).

b. Herstellung von Kernpräparaten

Bevor die Kerne das zweite Mal mit 0.95 %-iger NaCl gewaschen wurden, wurde auf einem Objektträger ein Ausstrich des Kernpellet angefertigt. Der Ausstrich wurde anschließend nach Giemsa gefärbt.

Einige der so hergestellten Kernpräparate sind auf den folgenden Abbildungen zu sehen.

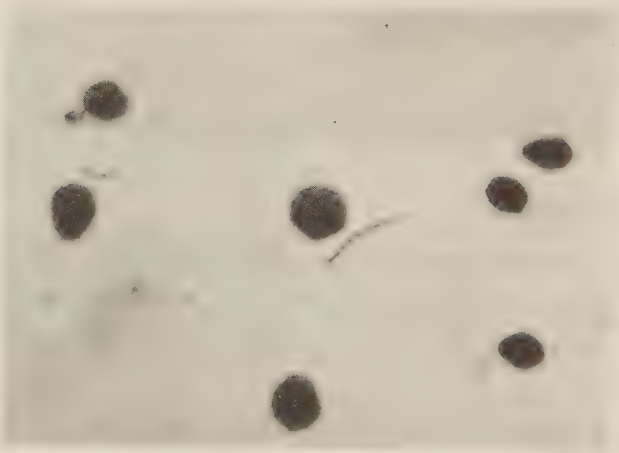

Abb. 4 Kernpräparat der Leber.
Färbung: Giemsa; Vergrößerung: 600 x;

Abb. 5 Kernpräparat der Milz.
Färbung: Giemsa; Vergrößerung: 600 x;

Abb. 6 Kernpräparat der Niere.
Färbung: Giemsa; Vergrößerung: 600 x;

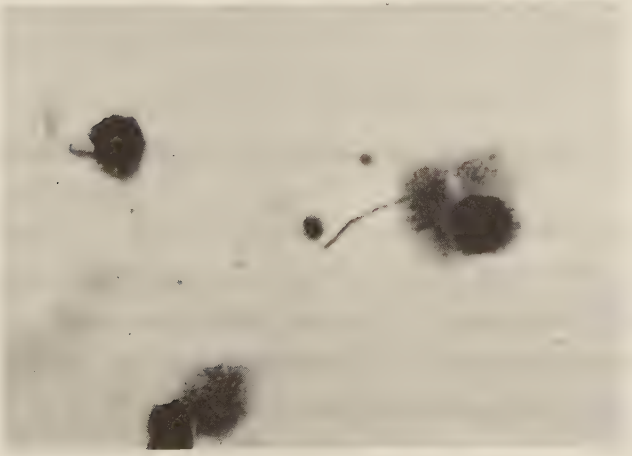

Abb. 7 Kernpräparat des Dünndarm.
Färbung: Giemsa; Vergrößerung: 600 x;

Die Aufnahmen (Abb. 4-8) entstanden in Ölimmersion mit einem Schwarz-Weiß-Film (Film: Agfa-Ortho; Empfindlichkeit: 15 DIN; Objektiv: 100/1.25).

c. Extraktion des Gesamthistons

Die gewaschenen Kerne wurden über Nacht mit 5 ml eines Gemischs aus Äthanol abs./1.25 N HCl (4:1) extrahiert. Dann wurde der Kernpellet abzentrifugiert (4000 g, 4°C, 10 Minuten) und der Vorgang wiederholt. Ein drittes Mal wurde mit 10 ml 0.25 N HCl extrahiert, nach nochmaliger Zentrifugation die Überstände vereinigt und mit dem 6-fachen Volumen an Aceton die Histone gefällt. Nach Abzentrifugieren der Histone (4000 g, 4°C, 10 Minuten) wurden sie zu Trockenpulver verarbeitet, indem sie mit 80 %-igem Äthanol, abs. Äthanol, Aceton und Äther gewaschen und jeweils abzentrifugiert wurden.

2.2.2.2 Proteinbestimmung des extrahierten Gesamthistons

Die Proteinbestimmung des Gesamthistons wurde durch Auftragen von 5-10 µl einer Histonlösung (10mg Histonpräparation/ml Auftragepuffer für die Gelelektrophorese) auf Zelluloseacetatstreifen durchgeführt (26). Die Färbung des Streifens erfolgte mit 1 %-igem Amidoschwarz 10 B (1 g Amidoschwarz 10 B/100 ml Entfärbelösung), um danach in drei aufeinanderfolgenden Entfärbebädern (Entfärbelösung: Eisessig/Methanol/Aqua dest. - 1:6:14) jeweils 10 Minuten ent-

färbt zu werden. Die entstandenen gefärbten Proteinflecken wurden ausgestanzt, in einer Mischung aus TCA/Ameisensäure/ Eisessig (1:1:8 - w/v/v) aufgelöst, und in einem Beckman-Spektralphotometer bei 648 nm die Extinktion gegen einen Leerwert gemessen. Die Auswertung des Proteingehalts erfolgte nach Erstellung einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin nach gleicher Methode.

Tabelle 2 Histonausbeute aus den Zellkernen verschiedener Organe

a. Ergebnisse aus dem Versuch mit L-Tryptophan(2,3-^{3}H)

	Leber	Milz	Nieren	Dünndarm
Histonmenge/ g Organ (in mg)	1.31	2.52	0.78	0.43

b. Ergebnisse aus dem Versuch mit L-Methionin(methyl-^{3}H) und DL-Leucin(4,5-$^3H_2$)

	Tier	Leber	Milz	Nieren	Dünndarm
Histonmenge/ g Organ (in mg)	A	1.34	3.44	0.92	1.48
	B	1.01	2.84	0.53	1.50
	C	1.38	3.55	0.79	1.14
	D	1.34	3.04	0.82	1.99

2.2.2.3 Gelelktrophoretische Auftrennung und Reinigung von Proteinen

Es wurde ein Gelsystem in Anlehnung an eine Arbeit von Borun et al. verwendet (6). Dabei handelt es sich um 12 %-ige Polyacrylamid-Gele mit 7.5 M Harnstoff und Triton X-100.

Herstellung der Gele

Stocklösung A: 60 % Acrylamid (w/v)
0.4 % N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)
in Wasser.

Stocklösung B: 25 % Triton X-100 (w/v)
in Wasser

weiterhin: Harnstoff, Eisessig und Temed.

Das in den Gelen verwendete Triton X-100 soll nach Hamana und Iwai (25) die elektrophoretische Beweglichkeit von Proteinen, speziell von Histonen, so verändern, daß man eine bessere Auftrennung der Histone in die einzelnen Fraktionen erhält.

Nach Herstellung dieser Stocklösungen wurden die benötigten Substanzen derart zusammengestellt, daß in den entstehenden Gelen folgende Endkonzentrationen herrschten:

12 % Acrylamid
0.08 % N,N'-Methylenbisacrylamid
7.5 M Harnstoff
0.9 N Essigsäure
6 mM Triton X-100
0.4 % Temed

Dieses Gemisch wurde, nachdem eine 0.2 %-ige Ammoniumpersulfat-Lösung zugesetzt worden war, um den Polymerisationsvorgang zu starten, in Glasrohre von 15 cm Länge und 0.5 cm Innendurchmesser etwa 12 cm hoch aufgefüllt. Anschließend wurde mit Wasser überschichtet, um eine Meniscusbildung zu vermeiden. Nach 30-60 Minuten waren die Gele polymerisiert, so daß mit der Vorelektrophorese begonnen werden konnte. Durch diesen Vorgang werden die restlichen Peroxide aus dem Gel entfernt, die die eigentliche Elektrophorese stören.

Vorelektrophorese: Dazu wurden die fertigen Gele in den Gelelektrophorese-Apparat gesteckt und mit einer Lösung bestehend aus 7.5 M Harnstoff und 6 mM Triton X-100, gelöst in 0.9 N Essigsäure, überschichtet und 16 Stunden bei einer Spannung von 100 V elektrophoriert. Als Elektrodenpuffer diente 0.9 N Essigsäure.
Danach wurde der Oberpuffer und die überschichtete Lösung verworfen und derselbe Vorgang wiederholt, wobei jetzt zusätzlich zu der ersten Vorelektrophorese-Lösung eine zweite Lösung benutzt wurde, die sich aus 0.5 % Cysteamin, 10 mM Dithiothreitol, 7.5 M Harnstoff und 6 mM Triton X-100, gelöst in 0.9 N Essigsäure, zusammensetzte. Diese zweite Lösung wurde unter die erste unterschichtet, und die Elektrophorese bei einer Spannung von 200 V über 20 Minuten ausgeführt. Erst jetzt konnte die eigentliche Elektrophorese gestartet werden.

Elektrophorese: Die Histone bzw. andere in dieser Arbeit verwendeten basischen Proteine wurden zu diesem Zweck in

einer Lösung aufgelöst, die 7.5 M Harnstoff, 10 % Mercaptoäthanol und 10 mM Dithiothreitol enthielt. Pro Gel wurden jeweils 200 µg Protein aufgetragen, die in 20-30 µl dieser Lösung gelöst waren.

Die gelelektrophoretische Trennung wurde bei 2 mA/Gel und einem Spannungsgradienten von ca. 10 V/cm ausgeführt. Die Elektrophoresedauer betrug 4-5 Stunden.

Gelfärbung: Als Färbelösung wurde 1 %-iges Bromphenolblau in 70 Teilen 7 %-ige Essigsäure und 30 Teilen Methanol benutzt. Die Färbezeit betrug etwa 1 Stunde.

Danach wurden die Gele über zwei Tage mit einer Lösung, bestehend aus 70 Teilen 7 %-ige Essigsäure und 30 Teilen Methanol, entfärbt, wobei die Lösung täglich mehrmals gewechselt wurde. Die Absorption der gefärbten Banden wurde bei 583 nm mit einem Vitatron-Densitometer gemessen.

2.2.2.4 Bestimmung des ^{3}H-Tryptophangehalts von Histonen durch Verbrennung von Polyacrylamid-Gelen

a. Vorbereitung der Gele zur Verbrennung

Die aus den Kernen der einzelnen Organe isolierten Histone wurden mittels Gelelektrophorese in ihre Unterfraktionen aufgetrennt, und nach Färbung und Entfärbung der Gele die verschiedenen Histonbanden mit einer scharfen Rasierklinge ausgeschnitten.

Zur Verbrennung dienten 500 ml fassenden Glaskolben, an deren Stopfen ein Platinnetz befestigt war. Die ausge-

schnittenen Gelscheibchen wurden zunächst in ein Filterpapier eingewickelt, dann in das Platinnetz eingeklemmt und 12 Stunden in einem Trockenschrank bei 110°C getrocknet.

b. Verbrennungsvorgang

Die Glaskolben standen zur Verbrennung in einem Eisbad und waren mit 3 ml Aqua dest. gefüllt. Die Filterpapiere mit den darin enthaltenen Gelscheibchen wurden entzündet und in den Glaskolben unter Sauerstoffathmosphäre verbrannt. Nach der Verbrennung wurden die Kolben mit dem destillierten Wasser ausgeschwenkt. Die Messung der ^{3}H-Aktivität erfolgte nach Überführen des Wassers in Tricarbgläschen und Auffüllen mit 15 ml Szintillationsmedium im Tricarb. Ebenso, wie mit den einzelnen Histonbanden, wurde mit den, bei den Tierversuchen gewonnenen Serumproben und dem Gesamthiston der einzelnen Organe verfahren. 20 µl Serum bzw. 20 µl Gesamthiston wurden auf das Filterpapier aufgetropft, getrocknet und verbrannt.
Als Standard diente Polymethyl Methacrylate-^{3}H.

2.2.2.5 Flüssigkeits-Chromatographie von Pyridoxyl-Aminosäuren zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität von ^{3}H-Methionin und ^{3}H-Leucin im Serum

Bei diesem Verfahren wird Pyridoxal in alkalischer Lösung mit Aminosäuren kondensiert (32). Die sich hierbei bildende Schiffsche Base der Aminosäure wird durch Reduktion der Doppelbindung mit $NaBH_4$ in die entsprechende Pyridoxyl-

aminosäuren überführt. Das Reaktionsschema ist aus Abb 9 ersichtlich.

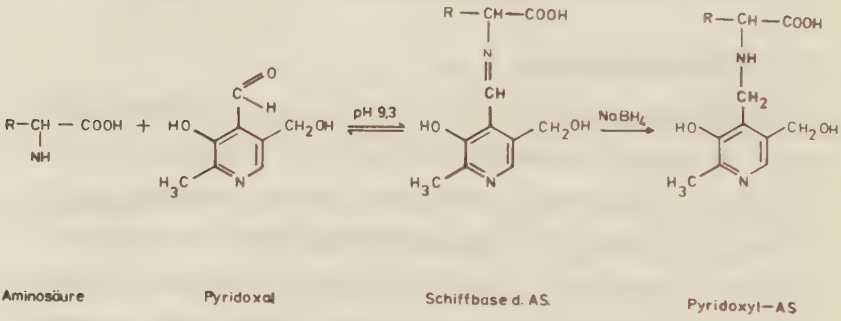

Abb. 9 Reaktionsschema der Aminosäure mit Pyridoxal.

a. Umsatz der Seren mit Pyridoxal

Während der Infusion von L-Methionin(methyl-^3H) und DL-Leucin(4,5-$^3H_2$) wurden pro Versuchstier 13 Blutproben entnommen und daraus am Ende des Versuchs durch Zentrifugation das Serum gewonnen. Zur Bestimmung des Verlaufs der spezifischen Radioaktivität der infundierten Aminosäuren während des Versuchs im Serum wurden von jeder Probe 50 µl Serum verwendet. Zusätzlich wurden Mischproben aus 12 Seren eines Versuchs (Endvolumen 120 µl) hergestellt.

Die Seren wurden mit dem gleichen Volumen an 0.5 M Phosphatpuffer (Na_2HPO_4) pH 9.3 versetzt. Die entstandene Lösung wurde mit der gleichen Menge einer frisch bereiteten, auf pH 9.3 eingestellten, 0.4 M Pyridoxallösung gemischt. Das

gelbe Reaktionsgemisch wurde 2 Minuten danach durch Zugabe einer alkalischen $NaBH_4$-lösung (100 mg in 1 ml 0.1 N NaOH) entfärbt. Die restlichen nicht umgesetzten Proteine ließen sich 15 Minuten später durch Zugabe von 50-150 µl 100 %-ige TCA fällen und nach einstündigem Stehen im Eisbad abzentrifugieren. Die Überstände dienten zur Aminosäurenanalyse.

b. Flüssigkeits-Chromatographie

Die Aminosäureanalyse wurde unter folgenden Säulenbedingungen durchgeführt:

Harz	:	DC 4A
Säulenvolumen	:	0.3 x 30 cm (Füllhöhe 29 cm)
Temperatur	:	74°C
Druck	:	30 Atm
Durchflußrate	:	12 ml/h

Als Elutionspuffer dienten 0.2 N Natriumcitratpuffer pH 3.4 für 2.5 Stunden und 0.2 N Natriumcitratpuffer pH 4.25 für 1.5 Stunden.

Zum fluorometrischen Nachweis der Pyridoxyl-Aminosäuren wurde ein Ratiofluorometer benutzt, dessen Quecksilberlampe die Pyridoxyl-Aminosäuren über ein Breitband-Filter U 11 (Fa. Schott) bei 330 nm anregte. Die Fluoreszenz wurde mit einem Kanten-Filter KV 370 (Fa. Schott) bei einer halbmaximalen Durchlässigkeit von 370 nm gemessen. Ein angeschlossener Schreiber zeichnete die Fluoreszenzkurven auf. Zusätzlich bestand Verbindung zu einem Interface, das die analogen Fluoreszenzwerte digitalisierte. Diese digitalen Werte konnten mit Hilfe eines Fernschreibers vom Typ Tele-

type einmal auf Lochstreifen und zum anderen als Datenstreifen gewonnen werden, um dann mit einem speziellen Programm im Rechenzentrum der Universität Würzburg unter folgenden Gesichtspunkten ausgewertet zu werden:

1. Peakerkennung und -integration
2. Abzug der Leerfluoreszenz am Ort des Peak
3. Ausgabe der Peakfläche (und der Leerfluoreszenz) als Tabelle
4. Vollständige Wiedergabe der Analyse als Plotterkurve mit Angabe der Leerfluoreszenz

Der Aufbau des Aminosäurenanalysators bei der Pyridoxalmethode ist in Abb. 10 wiedergegeben.
Abb. 11 zeigt die Plotterkurven des Rechenzentrums für die Analyse eines Aminosäuren-Standards und einer Serumprobe.

c. Aktivitätsmessung

Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler in Fraktionen von 1 ml Volumen aufgefangen, mit 15 ml Szintillationsmedium versetzt und im Flüssigkeits-Szintillationszähler (Tricarb, Modell 3380) die Aktivität gemessen.

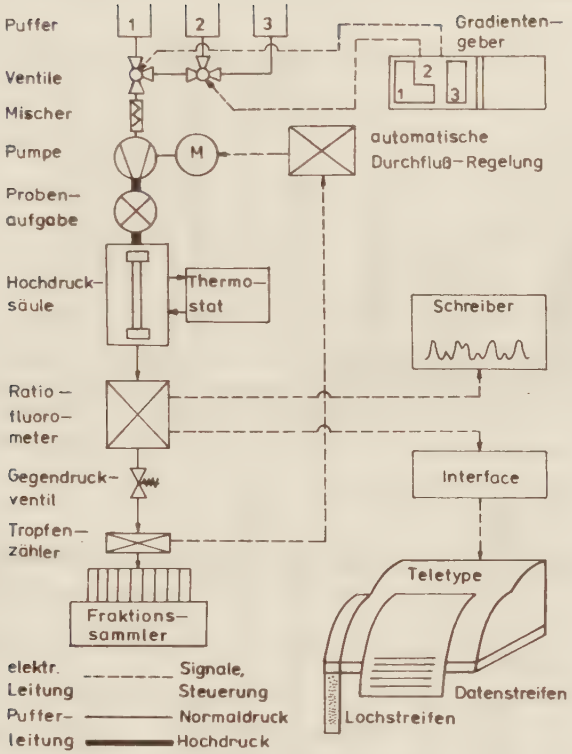

Abb. 10 Aufbau des Aminosäureanalysators zur Flüssigkeits-
chromatographie

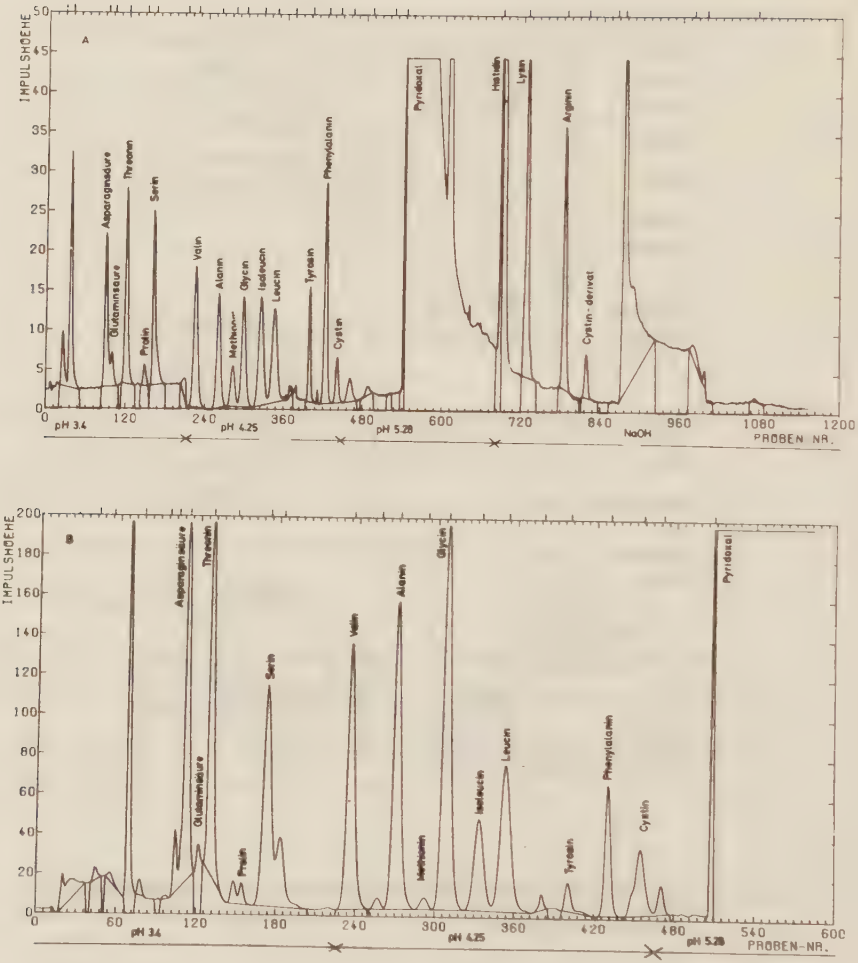

Abb 11 Plotterkurven von Aminosäureanalysen nach Auswertung im Rechenzentrum. Vergleich zwischen einem Aminosäurestandard A (Pierce-Aminosäurestandard: 0,5 nmol/ Aminosäure) und einer Serumprobe B (Auftrag: 50 µl einer mit Pyridoxalhydrochlorid umgesetzten Serumprobe.)

2.2.2.6 Elution von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen

Durch die Methoden der Gelelektrophorese lassen sich z.B. Histone gut in ihre Unterfraktionen auftrennen oder Verunreinigungen von Proteinen abtrennen, doch stehen die gereinigten Proteine weiteren analytischen Verfahren nicht mehr zur Verfügung. Diesem Nachteil begegnet man in letzter Zeit dadurch, daß man versucht die Proteine ebenfalls elektrophoretisch wieder aus den Gelen herauszulösen (7). In Anlehnung an eine Arbeit von Braatz und McIntire wurde ein Verfahren entwickelt, das es gestattet Proteine mit einer relativ hohen Rückgewinnungsrate aus Polyacrylamid-Gelen herauszulösen.

a. Elektrophorese von mit ^{131}J radioaktiv markiertem basischen Myelinprotein

Als Beispielprotein wurde mit ^{131}J radioaktiv markiertes basisches Myelinprotein (A_1-protein) gewählt, da es als basisches Protein ähnliche elektrophoretische Voraussetzungen bietet wie die Histone. Die Elektrophorese wurde mit oben beschriebener Methode durchgeführt. Nach Messung der Absorption der gefärbten Banden mit dem Vitatron-Densitometer wurde das Gel mit einer Rasierklinge in etwa 2 mm dicke Scheibchen geschnitten und die Aktivität pro Scheibchen in einem Gamma-Counter gemessen. Abb. 12 zeigt die Absorption bei 583 nm und die Aktivitätsverteilung im Gel vor der Elution. 12 Gele wurden auf diese Art und Weise bearbeitet und die Scheibchen mit der höchsten Aktivität gesammelt. So konnte man sicher sein, daß sämtliche

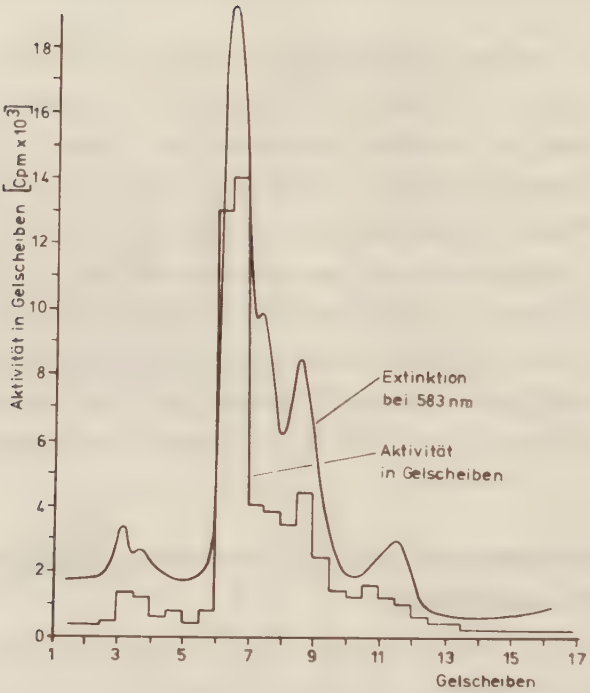

Abb. 12 Extinktionskurve von mit ^{131}J radioaktiv markiertem A_1-protein nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese bei 583 nm (Vitatron-Densitometer). Zusätzlich ist die in den Gelscheiben enthaltene Aktivität in Cpm eingezeichnet.

Verunreinigungen, die im A_1-protein vorlagen, abgetrennt wurden.

b. Elutionsanordnung

In 8 cm lange Glasrohre, deren Durchmesser etwas größer war, als die zur Elektrophorese benutzten (die Gele quollen während der Färbung und Entfärbung auf), wurde ein 4 cm langes Dichtungsgel eingegossen (Abb 13). Nach Polymerisierung und Vorelektrophorese des Dichtungsgels wurden die Gelscheibchen,

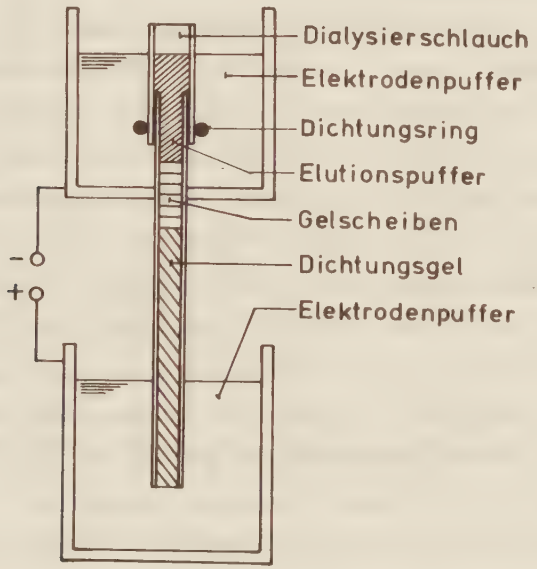

Abb 13 Versuchsanordnung zur Elution von Proteinen aus den Gelscheibchen.

meist 4 - 5 Stück pro Elutionsgel, in das Glasrohr eingebracht, und in den Gelelektrophorese-Apparat gesteckt. Mit Hilfe eines Dichtungsrings wurde jetzt noch ein ca. 3 cm langes Stück Dialysierschlauch am offenen Ende des Glasrohres befestigt. Im Gegensatz zu Braatz und McIntire wurde das obere Ende des Schlauchs nicht zugebunden, da bei der Elektrophorese der Proteine aus den Gelscheiben in den zugebundenen Schlauch ein recht hoher Verlust an Protein durch die Membran in den Elektrodenpuffer festgestellt wurde.

c. Elutionsvorgang

Nachdem die Elutionsanordnung so aufgebaut war, wie in Abb. 13 zu erkennen, wurde in den offenen Dialysierschlauch 0.9 N Essigsäure so hoch wie der Elektrodenpuffer (ebenfalls 0.9 N Essigsäure) gefüllt, und eine Spannung von 4 mA/Gel angelegt. Die Spannung wurde so gepolt, daß die Wanderungsrichtung der Proteine in Richtung Dialysierschlauch erfolgte. Um die oben schon angesprochenen Proteinverluste möglichst klein zu halten, wurde die in Abb. 13 mit Elutionspuffer bezeichnete 0.9 N Essigsäure alle 0.5 Stunden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt, in Rundkolben gesammelt und der Schlauch wieder mit neuer 0.9 N Essigsäure gefüllt. Das ganze Verfahren wurde über mindestens 6 Stunden ausgeführt. Von jeder halbstündlichen Elutionsfraktion wurde ein Aliquot entnommen und zur Bestimmung der Rückgewinnungsraten benutzt. Der Rest, der in den Rundkolben gesammelten eluierten Proteine, wurde gefriergetrocknet.

d. Rückgewinnungsraten bei der Elution

Abb. 14 zeigt einen Überblick über die Rückgewinnungsraten und Verluste bei der Elution von A_1-protein aus mehreren Versuchen. Es bleibt eine erhebliche Restaktivität im Gel zurück, die den Hauptanteil der Verluste ausmacht. Außerdem verliert man Aktivität, und damit Protein, durch Diffusion

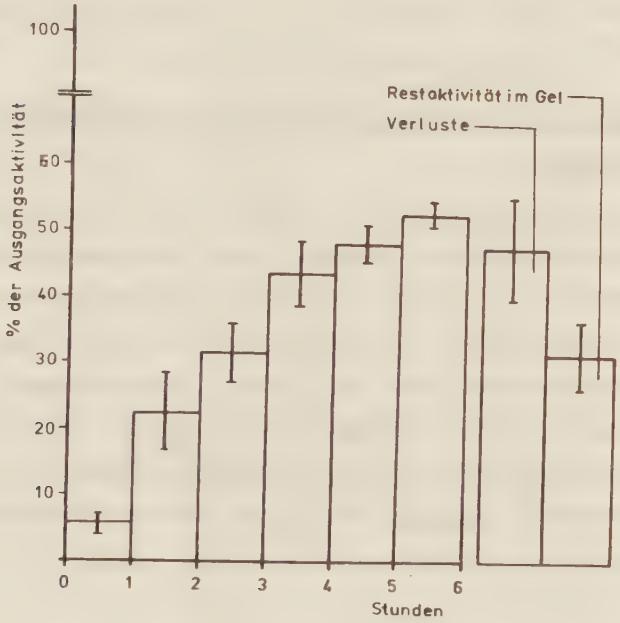

Abb. 14 Rückgewinnungsraten im Vergleich zur Ausgangsaktivität. Bei einer Rückgewinnungsrate von 52.5 % ergibt sich ein Verlust von 47.5 %, der sich im wesentlichen aus einer im Gel verbleibenden Restaktivität zusammensetzt.

durch den Dialysierschlauch und durch Absorption an den Dialysierschlauch. Dies konnte durch Aktivitätsmessungen im Elektrodenpuffer und der Dialysierschläuche bestätigt werden. Die Rückgewinnungsraten in diesen Versuchen beliefen sich im Mittel auf 52.5 % der Ausgangsaktivität. Die eluierte Aktivität stieg in den ersten 3 Stunden schnell an, um dann in eine Plateauphase überzugehen, in der keine zusätzliche Aktivität mehr eluiert werden konnte. Aus diesem Grunde wurden die Versuche jeweils nach 6 Stunden abgebrochen.

e. Elektrophorese des eluierten und gefriergetrockneten A_1-protein

Um einen Eindruck von der Effektivität dieses Reinigungs- und Elutionsprozesses zu bekommen, wurde mit dem eluierten und gefriergetrockneten A_1-protein eine nochmalige Elektrophorese durchgeführt. Nach Färbung und Messung der Absorption ergab sich ein Bild, das in Abb. 15 wiedergegeben ist. Zum Vergleich mit dem Ausgangsprotein sind noch einmal beide Absorptionsmuster untereinander abgebildet worden. Man erkennt deutlich, daß durch die Elution sämtliche Verunreinigungen, die das Ausgangsprotein enthielt, abgetrennt wurden.

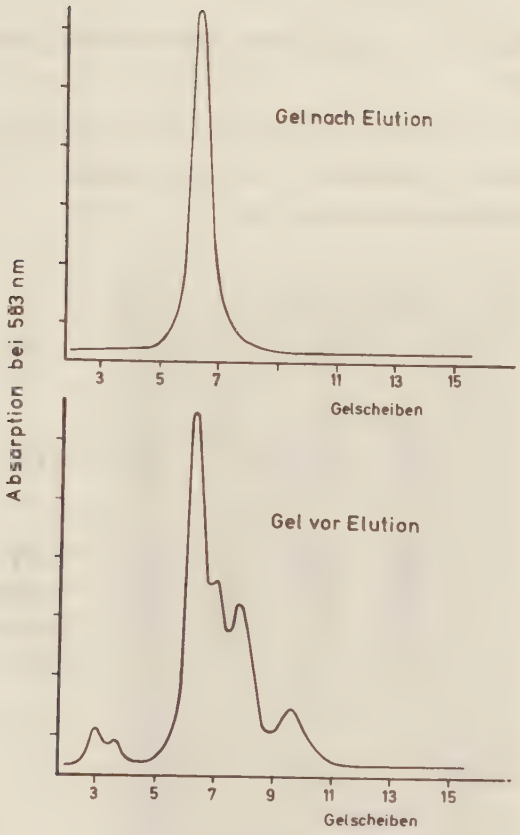

Abb. 15 Absorptionsmuster von A_1-protein vor und nach der Elutionselektrophorese. Die Gelelektrophorese nach der Elution zeigt ein von seinen Verunreinigungen befreites A_1-protein.
(Absorption bei 583 nm im Vitatron-Densitometer)

2.2.2.7 Elution von Histonen aus Polyacrylamid-Gelen

a. Elektrophorese der Histone verschiedener Organe der Ratte

Die Elektrophorese wurde wie in Punkt 2.2.2.3 beschrieben durchgeführt. Ein Beispiel für das Bandenmuster nach Entfärbung der Gele zeigt Abb. 16.

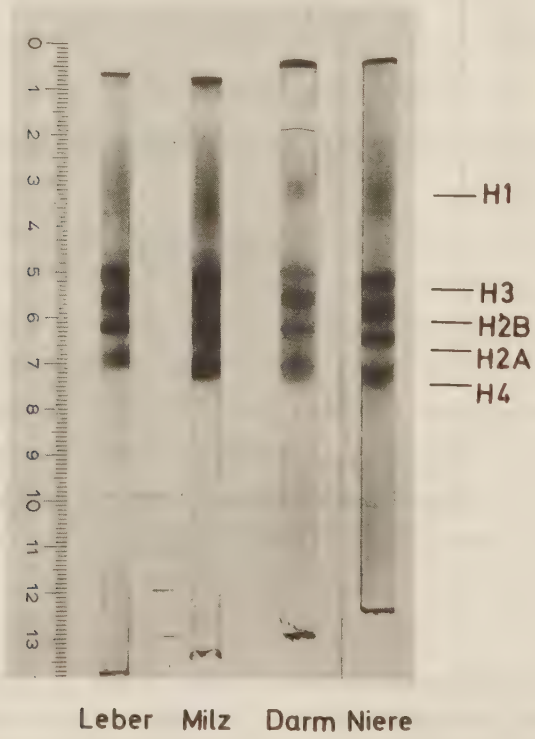

Abb. 16 Gelelektrophoretische Auftrennung der Histone verschiedener Organe der Ratte.

b. Elution von Histonen aus Polyacrylamid-Gelen

Zur Elution der Histone wurden von einem Organ jeweils 12 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen angefertigt. Nach Färbung mit Bromphenolblau und Entfärbung wurden aus diesen Gelen gleiche Banden, z.B. H1, H3 H2B usw. mit einer Rasierklinge ausgeschnitten. Jeweils 4 - 5 Gelscheiben der gleichen Sorte wurden jetzt in ein Elutionsröhrchen gesteckt und, wie am Beispiel des A_1-proteins beschrieben, eluiert. Der Elutionspuffer wurde für jede Bande separat gesammelt und nach Beendigung der Elution gefriergetrocknet.

c. Dialyse zur Entfernung überschüssigen Harnstoffs

Überschüssiger Harnstoff in den Histonproben stört nach der Hydrolyse die Umsetzung mit Pyridoxalphosphat und die anschließende Aminosäureanalyse. Aus diesem Grunde wurde versucht diesen Harnstoff abzudialysieren. Um Proteinverluste durch unnötig lange Dialysierzeiten zu vermeiden, wurde die Zeit bestimmt, in der der Harnstoff zu fast 100 % aus dem Dialysat entfernt war. Dazu wurde eine 6 M Harnstofflösung in 0.1 N HCl hergestellt, von der 2 ml in Dialysierschläuche von 1 cm Durchmesser eingebracht wurden. Vorher war jede Probe mit ^{14}C-Harnstoff versetzt worden. Die ^{14}C-Aktivität wurde vor der Dialyse, und in verschiedenen Abständen nach der Dialyse gemessen. Nachstehende Tabelle 3 gibt einen Überblick über das Ergebnis des Dialysierversuchs. Man erkennt, daß schon nach einer Stunde Dialysierzeit 96.2 % des Harnstoffs aus dem Dialysat entfernt waren.

Tabelle 3 Bestimmung der kürzesten Dialysierzeit mit ^{14}C-Harnstoff

Dialysierzeit	^{14}C-Ausgangs-aktivität (Cpm)	^{14}C-Aktivität nach Dialyse (Cpm)	% abdialysierte Aktivität
1 Stunde	3867.0	147.0	96.2
2 Stunden	3224.0	98.0	97.0
19 Stunden	2679.0	67.0	97.5
21 Stunden	2556.0	61.0	97.6

Nachdem jetzt die kürzest mögliche Dialysierzeit feststand, wurden die eluierten Histone nach der Gefriertrocknung in jeweils 2 ml 0.1 N HCl aufgenommen, in den Dialysierschlauch verbracht und 1 Stunde gegen 0.1 N HCl dialysiert.

2.2.2.8 Bestimmung der spezifischen Radioaktivität des Methionin, Leucin und der basischen Methyllysine der einzelnen Histonfraktionen

a. Hydrolyse der elektrophoretisch getrennten und eluierten Histone

Nach der Dialyse der Histonfraktionen wurden die einzelnen Dialysate mit 6 N HCl versetzt und unter Zusatz von 1 % Thiodiglykol bei 110°C 24 Stunden lang unter Stickstoffathmosphäre hydrolysiert.

Andere Autoren setzten dem Hydrolysat 0.1 % Mercaptoäthanol zu, um Methioninsulfoxid während der Hydrolyse zu Methionin zu reduzieren (4). In diesem Versuch wurde dem Hydrolysat Thiodiglykol zugesetzt, um die Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid zu verhindern.
Nach der Hydrolyse wurden die Fraktionen im Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt und anschließend in jeweils 300 µl Aqua dest. aufgenommen.

b. Aminosäurenanalysen der Histonhydrolysate

1. Bestimmung der Aktivität

Die Aktivität der Aminosäuren Methionin, Leucin und der basischen Methyllysine wurde mit einem automatischen Aminosäuren-Analysator Liquimat III der Firma Kontron, München, unter folgenden Bedingungen bestimmt:

Harz	:	M-82
Säulenvolumen	:	0.9 x 60 cm
Temperatur	:	25°C
Druck	:	15 - 25 Atm
Durchflußrate	:	10 - 12 ml/h

Die Säule wurde mit 0.35 N Natriumcitrat-Puffer pH 4.25 äquilibriert. Dann wurde die Probe aufgetragen und Methionin und Leucin mit einem Puffer pH 4.25 eluiert. Die Abtrennung der basischen Methyllysine von der Säule erfolgte mit 0.35 N Natriumcitrat-Puffer pH 6.92.
Das Eluat wurde in 6-Minuten-Fraktionen mit einem Fraktionssammler aufgefangen, 10 ml Szintillationsmedium zugestzt,

und im Tricarb gemessen.

2. Bestimmung der Aminosäuremengen

Die zur Bestimmung der Menge der Aminosäuren Methionin, Leucin und der basischen Methyllysine herangezogene Aminosäurenanalyse war auch dieses Mal die unter Punkt 2.2.2.5 beschriebene Flüssigkeits-Chromatographie von Pyridoxyl-Aminosäuren.

In diesem Fall wurden 50 µl eines 0.5 M Kaliumphosphat-Puffers pH 9.3 mit 50 µl des Histonhydrolysats versetzt. Die Reaktion zur Schiffbase der Aminosäure wurde mit 100 µl einer 0.2 M Pyridoxalhydrochlorid-lösung pH 9.3 gestartet und nach einer Reaktionszeit von 3 Minuten mit Hilfe einer 10 %-igen $NaBH_4$-lösung (100 mg $NaBH_4$ auf 1 ml 0.1 N KOH) gestoppt. Zur Aminosäureanalyse mußte die entstandene Lösung noch mit 100 µl einer 1 N HCl angesäuert werden.

Folgende Säulenbedingungen wurden zur Analyse gewählt:

Harz	:	DC6A
Säulenvolumen	:	0.4 x 40 cm (Füllhöhe 30 cm)
Druck	:	30 Atm
Temperatur	:	71°C
Durchflußrate	:	18 ml/h

Als Puffer dienten 0.2 N Citratpuffer mit den pH-werten 2.79, 3.28 und 4.25, mit denen die Aminosäuren sukzessive vom Harz gelöst wurden. Der fluorometrische Nachweis der Pyridoxyl-Aminosäuren wurde mit einem 2-Kanal-Fluorometer durchgeführt. Angeregt wurden die Aminosäuren mit einer Quecksilberlampe über ein Breitband-Filter U 11 bei ca.

330 nm, zur Fluoreszenzmessung diente das Kanten-Filter KV 370 mit einer halbmaximalen Durchlässigkeit bei 370 nm. Aufzeichnung und Auswertung der Meßdaten erfolgte nach dem in Punkt 2.2.2.5 beschriebenen Schema.

2.2.2.9 Probleme bei der Auswertung der Aminosäurenanalysen zur Mengenbestimmung von Methionin, Leucin und der basischen Methylysine

Nach Durchführung der Aminosäurenanalysen, zeigte der Vergleich eines Standards mit einer beliebig ausgewählten Probe - in diesem Fall das Leberhiston H4 - , daß die Aminosäuren Methionin, Leucin sowie die basischen Methyllysine entweder nicht nachzuweisen waren, oder bei der Auswertung auf direktem Wege keine verwendbaren Ergebnisse ergaben (Abb. 17 und 18).

Methionin fehlt hier zum Beispiel völlig. Es ist anzunehmen, daß es während der Aufarbeitungszeit fast vollständig zu Methioninsulfoxid oxidiert wurde, obwohl verschiedene Zusätze dies verhindern sollten. In dem zu diesen Mengenbestimmungen angefertigten Radioaktivitätsprofile ist diese Oxidation deutlich zu erkennen (Abb. 19 und 20). Methionin liegt hier bis auf eine kleine Restmenge als Methioninsulfoxid vor. Es läßt sich allerdings noch eine geringe Menge an Radioaktivität für Methionin messen, was wohl daran liegt, daß für die Radioaktivitätsbestimmung eine 4 - 8 fach größere Menge an Aminosäurenhydrolysat verwendet wurde.

Leucin wird durch den, im Vergleich zum Standard, frühzei-

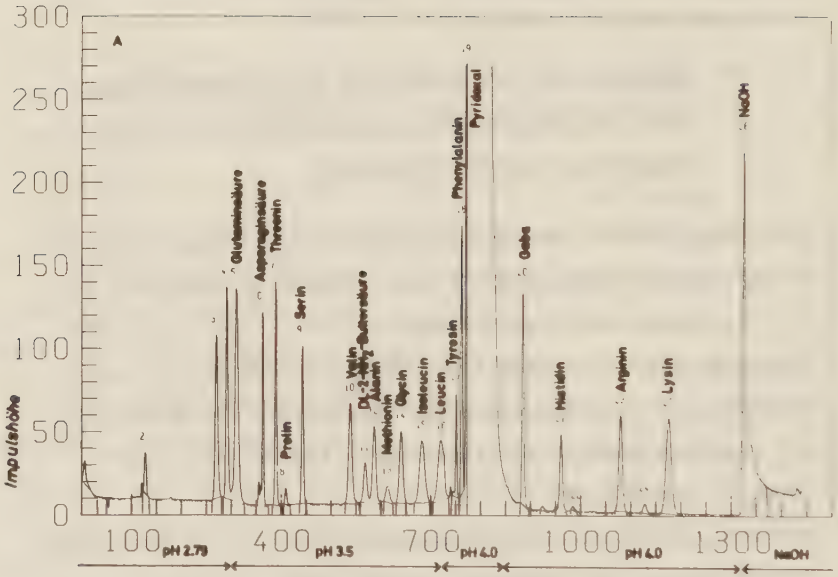

Abb. 17 Plotterkurve eines Aminosäurestandards nach Auswertung im Rechenzentrum.
A: Pierce-Aminosäurestandard (0.5 nmol/Aminosäure)
Impulshöhe = Fluoreszenz

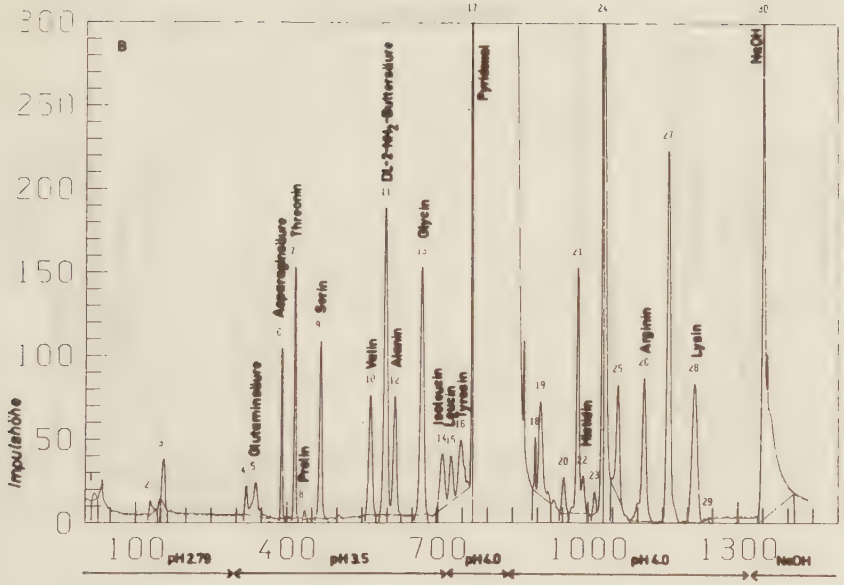

Abb. 18 Plotterkurve einer Histonprobe nach Auswertung im Rechenzentrum
B: Leberhiston H4
Auftrag: 50 µl des mit Pyridoxalhydrochlorid umgesetzten Histonhydrolysats.
Impulshöhe = Fluoreszenz

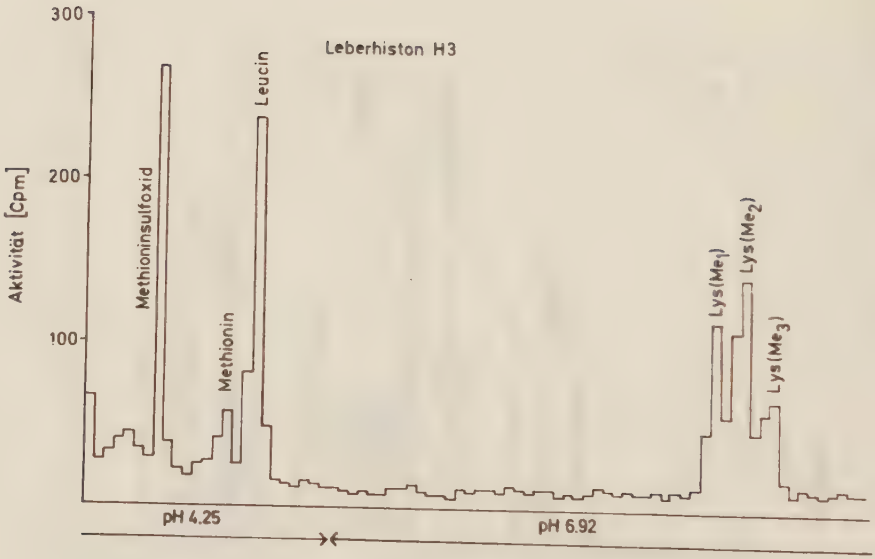

Abb. 19 Aktivitätsprofil des Leberhiston H3 nach der Aktivitätsbestimmung mit dem Aminosäurenanalysator Liquimat III.
Methionin liegt zum größten Teil als Methioninsulfoxid vor.
Im H3-Histon liegen sämtliche Methylierungsstufen bis zum N^{ε}-Trimethyllysin vor.

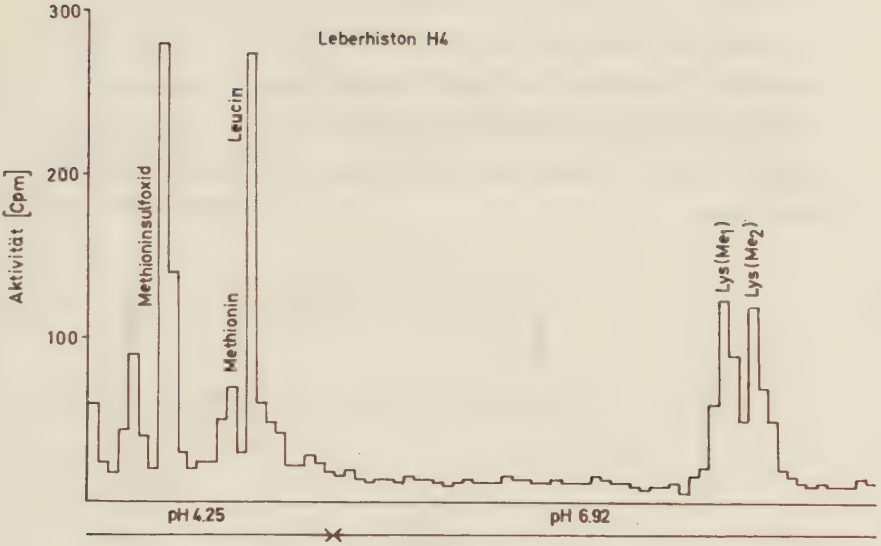

Abb. 20 Aktivitätsprofil des Leberhiston H4 nach der Aktivitätsbestimmung mit dem Aminosäurenanalysator Liquimat III.
Methionin liegt auch hier zum größten Teil als Methioninsulfoxid vor.
Das H4-Histon weist die Methylierungsstufen nur bis zum N^{ε} -Dimethyllysin auf.

tiger erscheinenden und breiter ausfallenden Pyridoxalpeak nur ungenügend von Isoleucin und Tyrosin abgetrennt, so daß die wahre Menge nicht direkt zu bestimmen ist.
Der Bereich der Basischen Methyllysine, der normalerweise zwischen Pyridoxal und Histidin liegt, wird ebenfalls von Pyridoxal abgedeckt und macht eine Auswertung unmöglich. Zudem sind die basischen Aminosäuren durch Verunreinigungen aus den Gelen - basischen Spaltprodukte des Polyacrylamids - überlagert.

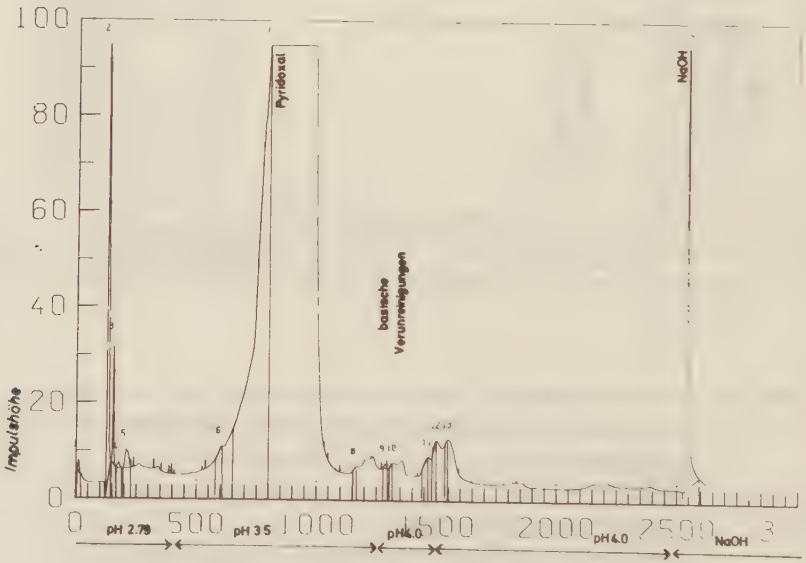

Abb. 21 Leergelanalyse eines nach gleicher Methode wie die eigentlichen Proben aufgearbeiteten Polyacrylamid-Gels.

Die basischen Methyllysine werden von basischen Verunreinigungen aus dem Gel abgedeckt.

2.2.2.10 Berechnung der Histonneubildungsraten und des Methylgruppenumsatzes

Bei Dauerinfusions-Experimenten mit radioaktiven Vorläufern lassen sich die Syntheseraten der Produkte (Aufbaukonstanten) relativ einfach bestimmen, wenn die spezifische Radioaktivität des Vorläufers am Ort der Synthese als quasi konstant angesehen werden kann.

Per definitionem gilt:

$$S_{Vorläufer} = \frac{Akt_{Vorläufer}}{M_{Vorläufer}}$$

Für den Aufbau des markierten Produkts gilt:

$$d_1 \frac{Akt_{Produkt}}{dt} = \frac{dM_{Produkt}}{dt} \; S_{Vorläufer}$$

$$d_1 \frac{S_{Produkt}}{dt} = \frac{dM_{Produkt}}{dt \; M_{Produkt}} \; S_{Vorläufer} = {}^{k}S_{Vorläufer} \quad (1)$$

Für den Abbau des markierten Produkts gilt:

$$d_2 \frac{Akt_{Produkt}}{dt} = - \frac{dM_{Produkt}}{dt} \; S_{Produkt}$$

$$d_2 \frac{S_{Produkt}}{dt} = - \frac{dM_{Produkt}}{dt \; M_{Produkt}} \; S_{Produkt} = - {}^{k}S_{Produkt} \quad (2)$$

Für die Nettoänderung der spezifischen Radioaktivität des Produkts ergibt sich:

$$\frac{dS_{Produkt}}{dt} = \frac{d_1 S_{Produkt}}{dt} + \frac{d_2 S_{Produkt}}{dt}$$

Setzt man (1) und (2) in obige Gleichung ein, so erhält man:

$$\frac{dS_{Produkt}}{dt} = k(S_{Vorläufer} - S_{Produkt})$$

$$S_{Produkt} = S_{Vorläufer}(1-e^{-kt})$$

$$k = \frac{\ln \frac{S_{Vorläufer}}{S_{Vorläufer} - S_{Produkt}}}{t} \qquad \text{(Gleichung 1)}$$

$$T = \frac{1}{k} \qquad \text{(Gleichung 2)}$$

Die mittlere Lebensdauer T ist der reziproke Wert der Aufbau- bzw. Abbaukonstanten des Produkts.

Die Ableitung ist nur gültig unter steady-state-Bedingungen, für proliferierende Systeme ist sie ungültig.

Die Gleichung 1 führt durch Einsetzen der entsprechenden Größen zu Aussagen über die Histonbiosyntheseraten (k), Bildung von histongebundenem N^{ε}-Monomethyllysin (k_1), N^{ε}-Dimethyllysin (k_2) und N^{ε}-Trimethyllysin (k_3):

$$k = \frac{\ln \frac{S_{Met^+}}{S_{Met^+} - S_{Met}}}{t} \qquad \text{(Gleichung 1a)}$$

$$k_1 = \frac{\ln \frac{S_{Met^+}}{S_{Met^+} - S_{Lys(Me_1)}}}{t} \qquad \text{(Gleichung 1b)}$$

$$k_2 = \frac{\ln \frac{S_{Met^+}}{S_{Met^+} - S_{Lys(Me_2)}}}{t} \qquad \text{(Gleichung 1c)}$$

$$k_3 = \frac{\ln \frac{S_{Met^+}}{S_{Met^+} - S_{Lys(Me_3)}}}{t} \qquad \text{(Gleichung 1d)}$$

S_{Met^+} : Spezifische Aktivität des Methionin im Serum (nCi/nmol)

S_{Met} : Spezifische Aktivität des histongebundenen Methionin (nCi/nmol)

$S_{Lys(Me_1)}$: Spezifische Aktivität des histongebundenen N^{ε}-Monomethyllysin (nCi/nmol)

$S_{Lys(Me_2)}$, $S_{Lys(Me_3)}$: Analog für Di- und Trimethyllysin

k : Geschwindigkeitskonstante der Histonbiosynthese

$k_{1,2,3}$: Methylierungskonstante für die Bildung methylierter Lysine aus den um eins weniger methylierten Vorstufen

t : Infusionsdauer (min)

3. ERGEBNISSE

3.1 Histonnachweis

Durch die im Tierversuch durchgeführte intraperitoneale Injektion von L-Tryptophan(2,3-^{3}H) sollte überprüft werden, ob die aus den Zellkernen isolierten Proteine Histone sind. Hnilica (28) hat gezeigt, daß Histone kein Tryptophan enthalten. Unter dieser Bedingung darf also kein radioaktiv markiertes Tryptophan in die isolierten Proteine eingebaut werden. In diesem Versuch konnte nach Verbrennung der Gele keine Radioaktivität in den Histonbanden nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist als indirekter Hinweis daraufhin zu werten, daß es sich bei den extrahierten Proteinen um Histone handelt.

3.2 Spezifische Radioaktivität der Vorläufer der Histonbiosynthese

Zur Bestimmung von Histonbiosyntheseraten dienten als Vorläufer L-Methionin(methyl-^{3}H) und DL-Leucin(4,5-$^{3}H_2$). Die Substanzen wurden den Tieren mittels Dauerinfusion über 130 Minuten verabreicht.
Der markierte Methylrest von L-Methionin(methyl-^{3}H) dient im weiteren zur Methylierung histongebundener Lysinreste. Die spezifische Radioaktivität des Methionin ist somit zur Bestimmung von Methylierungsraten notwendig.

Abb. 22 gibt den Verlauf der spezifischen Radioaktivität der Vorläufer Methionin und Leucin im Venenblut am Beispiel von Tier C während der Versuchszeit wieder. Zusätzlich ist in die Kurve die mittlere spezifische Radioaktivität der Vorläufer eingezeichnet, die in den Serummischproben von Tier C gemessen wurde. Die Flächen unter den Verlaufskurven entsprechen in etwa denjenigen unter den Serummischproben. Es ist also berechtigt die mittleren spezifischen Aktivitäten aus den Serummischproben den Berechnungen der Histonbiosyntheseraten zugrundezulegen. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die mittleren spezifischen Radioaktivitäten der Vorläufer in den Serummischproben der Tiere.

Tabelle 4 Spezifische Radioaktivitäten von ^{3}H-Methionin und ^{3}H-Leucin in den Serummischproben

	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D
Methionin (nCi/nmol)	98.0	102.0	70.3	114.4
Leucin (nCi/nmol)	44.1	40.7	28.0	41.7

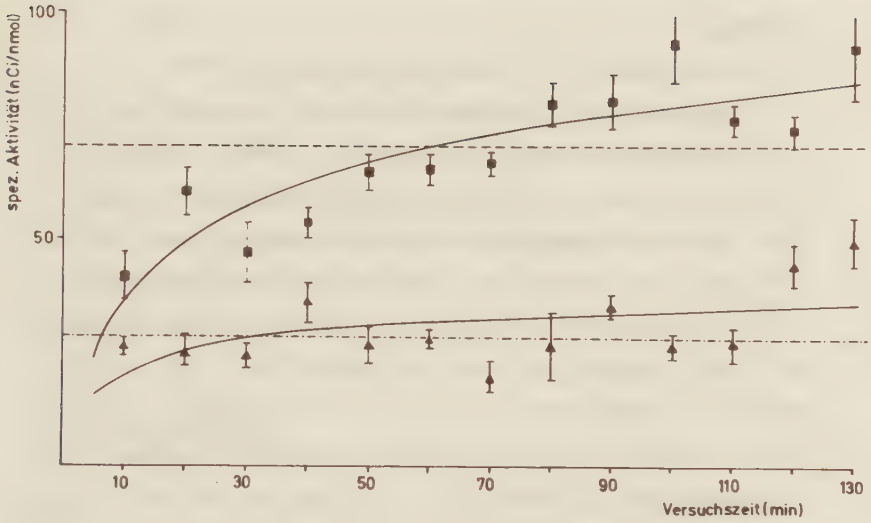

Abb 22 Verlauf der spezifischen Radioaktivität der Vorläufer Methionin und Leucin im Serum.
(Met ■—■ ; Leu ▲—▲)
(Mittelwerte aus 3 Serumanalysen von Tier C)
Zusätzlich ist die mittlere spezifische Radioaktivität für Methionin und Leucin in den Mischproben von Tier C eingezeichnet.
(Met -----; Leu -•-•-)
Dauerinfusionsversuch mit ^{3}H-Methionin und ^{3}H-Leucin.

Um nun Neubildungsraten für Histone zu berechnen, muß man sich fragen, ob die gemessene spezifische Radioaktivität der Vorläufer im Serum mit der spezifischen Radioaktivität von freiem Methionin und Leucin im Gewebe übereinstimmt.

Deimel und Maurer (20) zeigten, daß nach Injektion von ^{35}S-Methionin die spezifische Aktivität von Methionin in den Organen gleich der des Serums war. Andere Autoren (Gan und Jeffay, 23,24) haben dagegen nachgewiesen, daß nach Infusion markierter Aminosäuren auch nach mehreren Stunden in den Zellen eine niedrigere spezifische Radioaktivität vorlag als im Plasma. Die spezifische Radioaktivität lag in Organen wie Leber und Muskel nach Dauerinfusion markierter Aminosäuren, wie z.B. Lysin und Tyrosin, um 30 - 50 % niedriger als im Serum. Die im Organstoffwechsel entstehenden 'kalten Aminosäuren' sind die Ursache für die Verdünnung der 'heißen Aminosäuren' in den Organen.

Im folgenden wurden Histonbiosyntheseraten unter der Annahme berechnet, daß Methionin, dessen Organ- und Serumspiegel relativ gering ist, sich vollständig mit dem freien Methionin der Organe ins Gleichgewicht setzt. Unter dem Eindruck, daß Methionin im Organismus an vielen wichtigen Methylierungsreaktionen teilnimmt, ist diese Annahme sicherlich berechtigt. Die spezifische Aktivität des Methionin der neusynthetisierten Histone wurde also gleich der Plasmaaktivität des Vorläufers gesetzt.

Im Falle des Leucin, das im Serum und Gewebe in großer Menge vorliegt, ist die Verdünnung des 'heißen Leucin' mit

'kaltem Leucin' wesentlich größer. Fischbach (8) wies zudem nach, daß bei Verwendung von D-Aminosäuren, die im Organismus erst in ihre L-Form überführt werden müssen, die Aufnahme ins Gewebe wesentlich langsamer von statten geht als bei Verwendung von L-Aminosäuren. Eine weitere Verminderung der spezifischen Radioaktivität von freiem Leucin im Gewebe kommt also dadurch zustande, daß in diesem Versuch DL-Leucin(4,5-$^3H_2$) infundiert wurde. Aus diesem Grunde wurde die spezifische Radioaktivität des freien Leucin im Gewebe zur Berechnung von Histonbiosyntheseraten nur mit 25 % der Vorläuferaktivität von Leucin im Serum veranschlagt.

3.3 Histonneubildung

Um trotz der in 2.2.2.9 beschriebenen Auswertungsschwierigkeiten der Aminosäurenanalysen noch zu einer Aussage über die Histonneubildungsraten in Rattenorganen zu kommen, wurden mit Hilfe von Aminosäurenmengenangaben in der Literatur (33) Aminosäurenverhältnisse aufgestellt, die mit den Verhältnissen in dieser Arbeit verglichen wurden. Dieses Vorgehen sollte einmal Aufschluß über die Verwertbarkeit der Analysen geben und zum anderen als Grundlage zur Berechnung der Menge der nicht auszuwertenden Aminosäuren dienen. Ausgewertet wurden die Methioninreste tragenden Fraktionen H3, H2B und H4, wobei darauf geachtet wurde, daß die gefundenen Aminosäurenverhältnisse mit den Verhältnissen in der Literatur wenigstens in ein bis vier Verhältnissen in Annäherung

übereinstimmt (Tabelle 5).

3.3.1 Menge und spezifische Radioaktivität der Aminosäuren Methionin und Leucin

Die in Tabelle 5 aufgeführten Aminosäurenverhältnisse zeigten für die angegebenen Tiere eine relativ gute Übereinstimmung zwischen Literaturwerten und gemessenen Werten. Für die Fraktion H3 der Rattenmilz und für die Fraktion H2B des Darmes konnte die Aminosäureanalyse nicht ausgewertet werden. Da die Radioaktivitätsbestimmung in diesen Fraktionen aber gut gelungen ist, wurden hier die Literaturwerte allein für die Mengenbestimmung zugrundegelegt. Mit Hilfe der Angaben über die Anzahl der Methionin- und Lysinreste (Tabelle 1) war jetzt die Berechnung der Mengen und spezifischen Radioaktivitäten von Methionin und Leucin in den Histonfraktionen der Tabelle 5 möglich.

Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivitäten wurden die Radioaktivitätsprofile (Abb. 19 und Abb. 20 zeigen Beispiele für die Leberhistone H3 und H4 von Tier C) bzw. die Protokolle der Messung im Tricarb herangezogen (Tabelle 6).

Die Neubildungsraten der Rattenhistone wurden unter Verwendung von Gleichung 1a und der spezifischen Radioaktivität von Methionin und Leucin berechnet. Die dazu benötigte mittlere spezifische Radioaktivität der Vorläufer im Serum stammt aus Tabelle 4. Die spezifische Aktivität der Aminosäuren am Ort der Histonbiosynthese wird hierbei für Methionin zu 100 % und für Leucin zu 25 % der Serumaktivität angenommen.

Tabelle 5 Aminosäurenverhältnisse im Vergleich zur Literatur

a. Rattenleber

	Fraktion H2B			Fraktion H3			Fraktion H4		
	Literatur	Tier C	Tier D	Literatur	Tier C	Tier D	Literatur	Tier C	Tier D
Lysin (Mol %)	15.4	17.0	19.9	10.3	10.4	10.8	9.2	8.8	6.7
Lys/Arg	2.17	1.98	1.63	0.90	0.89	0.91	0.87	0.88	0.90
Lys/Asp	2.75	2.56	2.51	2.10	1.66	1.71	1.37	1.46	1.40
Lys/Thr	2.61	2.15	1.84	1.84	1.20	1.98	1.39	1.24	1.05
Lys/Ala	1.33	1.06	1.15	0.77	0.76	0.78	1.10	1.06	0.91
Lys/Val	2.37	2.20	2.35	1.94	1.55	1.70	1.31	1.22	0.90
Lys/Leu	2.61	--	--	1.07	--	--	0.95	--	--

b. Rattenmilz

	Fraktion H2B			Fraktion H3	Fraktion H4			
	Literatur	Tier C	Tier D	Literatur	Literatur	Tier B	Tier C	Tier D
Lysin (Mol %)	16.3	20.9	19.2	11.0	10.6	12.6	10.2	11.5
Lys/Arg	2.33	2.40	2.8	1.03	1.04	2.82	0.97	1.03
Lys/Asp	2.96	2.61	3.40	2.39	1.86	1.70	2.47	1.75
Lys/Thr	2.86	1.93	3.62	1.80	2.21	2.06	2.64	1.93
Lys/Ala	1.51	1.65	1.43	0.78	1.04	1.04	1.36	1.36
Lys/Val	2.47	2.23	3.84	2.16	1.54	2.60	1.78	--
Lys/Leu	2.59	--	--	1.31	1.29	--	--	--

c. Rattenniere

	Fraktion H2B		Fraktion H3			Fraktion H4		
	Literatur	Tier C	Literatur	Tier B	Tier C	Literatur	Tier B	Tier C
Lysin (Mol %)	16.7	16.0	10.8	13.9	11.9	11.6	8.7	10.2
Lys/Arg	1.84	1.66	0.78	0.92	1.01	0.85	0.83	0.91
Lys/Asp	2.83	1.46	2.35	3.19	3.53	2.00	2.01	2.35
Lys/Thr	3.28	3.38	1.93	1.60	1.77	2.58	1.93	2.18
Lys/Val	3.21	4.44	3.00	4.00	3.67	2.28	2.52	--
Lys/Ala	1.59	--	0.82	1.75	1.34	1.15	1.10	--
Lys/Leu	2.65	--	1.17	--	--	1.21	--	--

d. Rattendarm

	Fraktion H2B	Fraktion H3			Fraktion H4	
	Literatur	Literatur	Tier B_1	Tier B_2	Literatur	Tier B
Lysin (Mol %)	16.6	9.0	9.7	9.5	8.9	9.3
Lys/Arg	2.52	0.87	0.95	0.98	0.78	0.74
Lys/Asp	2.96	1.55	2.02	1.86	1.46	1.75
Lys/Thr	2.86	1.43	1.70	1.65	1.53	1.64
Lys/Val	2.81	2.00	2.40	2.21	1.56	1.38
Lys/Ala	1.43	0.69	0.50	0.65	0.80	1.11
Lys/Leu	2.91	0.90	--	--	0.91	--

Tabelle 6 Mengen und spezifische Radioaktivitäten von Methionin und Leucin in den Histonfraktionen

a. Rattenleber

	Menge (nmol)		spez. Aktivität (nCi/nmol)	
	Leu[a] (Leu[b])	Met[a] (Met[b])	Leu	Met
H2B (C)	6.53 (21.74)	1.71 (5.69)	0.080	0.130
H2B (D)	6.55 (21.81)	1.69 (5.63)	0.150	0.390
H3 (C)	9.75 (32.47)	1.60 (5.33)	0.010	0.140
H3 (D)	10.07 (33.52)	1.66 (5.52)	0.010	0.130
H4 (C)	9.21 (30.67)	0.80 (2.65)	0.010	0.190
H4 (D)	7.06 (23.52)	0.61 (2.03)	0.020	0.250

b. Rattenmilz

	Menge (nmol)		spez. Aktivität (nCi/nmol)	
	Leu[a] (Leu[b])	Met[a] (Met[b])	Leu	Met
H2B (C)	8.07 (26.90)	2.09 (6.97)	0.024	0.110
H2B (D)	7.41 (24.70)	1.92 (6.40)	0.042	0.086
H3 (C)	8.40 (27.80)	1.69 (5.64)	0.008	0.123
H4 (B)	9.77 (32.46)	1.15 (3.82)	0.006	0.178
H4 (C)	7.87 (26.23)	0.92 (3.08)	0.005	0.084
H4 (D)	8.93 (29.77)	1.05 (3.49)	0.007	0.177

c. Rattenniere

	Menge (nmol)		spez. Aktivität (nCi/nmol)	
	Leu[a] (Leu[b])	Met[a] (Met[b])	Leu	Met
H2B (C)	6.04 (20.13)	1.60 (5.30)	0.008	0.045
H3 (B)	11.80 (39.50)	2.13 (7.10)	0.009	0.100
H3 (C)	10.17 (33.90)	1.83 (6.10)	0.008	0.144
H4 (B)	7.20 (24.00)	0.80 (2.65)	0.009	0.138
H4 (C)	8.43 (28.10)	0.93 (3.10)	0.007	0.148

d. Rattendarm

	Menge (nmol)		spez. Aktivität (nCi/nmol)	
	Leu[a] (Leu[b])	Met[a] (Met[b])	Leu	Met
H2B (B)	5.70 (19.00)	1.66 (5.53)	0.030	0.119
H3 (B_1)	10.70 (35.80)	1.50 (4.95)	0.021	0.133
H3 (B_2)	10.60 (35.30)	1.47 (4.89)	0.022	0.135
H4 (B)	10.26 (34.21)	0.85 (2.83)	0.027	0.356

a Menge in 40 µl Probenauftrag zur Mengenbestimmung

b Menge in 200 µl Probenauftrag zur Aktivitätsbestimmung von ^{3}H-Methionin und ^{3}H-Leucin in den Histonfraktionen (siehe Punkt 2.2.2.8 b 1 und 2.2.2.8 b 2)

Tabelle 7 Biosyntheseraten und mittlere Lebensdauer der Rattenhistone. Dauerinfusionsversuch mit L-Methionin(methyl-^3H) und DL-Leucin(4,5-$^3H_2$)

a. Rattenleber

Histonfraktion	spez. Aktivität (Ci/mol)		Geschwindigkeit der Histonbiosynthese (d^{-1})		mittlere Lebensdauer (d)	
	Leu	Met	Leu	Met	Leu	Met
H2B (C)	0.080	0.130	(0.127)	0.021	(7.9)	48.8
H2B (D)	0.150	0.390	(0.161)	0.038	(6.2)	26.4
H3 (C)	0.010	0.140	0.016	0.022	63.2	45.3
H3 (D)	0.010	0.130	0.011	0.013	94.1	79.4
H4 (C)	0.010	0.190	0.016	0.030	63.2	33.6
H4 (D)	0.020	0.250	0.021	0.024	47.0	41.4

b. Rattenmilz

Histonfraktion	spez. Aktivität (Ci/mol)		Geschwindigkeit der Histonbiosynthese (d^{-1})		mittlere Lebensdauer (d)	
	Leu	Met	Leu	Met	Leu	Met
H2B (C)	0.024	0.110	0.048	0.017	21.0	57.7
H2B (D)	0.042	0.086	0.056	0.008	17.9	120.0
H3 (C)	0.008	0.123	0.016	0.019	63.1	51.6
H4 (B)	0.006	0.178	0.008	0.019	122.4	51.7
H4 (C)	0.005	0.084	0.010	0.013	101.1	75.5
H4 (D)	0.007	0.177	0.009	0.017	107.5	58.3

c. Rattenniere

Histon-fraktion	spez. Aktivität (Ci/mol)		Geschwindigkeit der Histonbiosynthese (d^{-1})		mittlere Lebensdauer (d)	
	Leu	Met	Leu	Met	Leu	Met
H2B (C)	0.008	0.045	0.013	0.007	76.9	141.0
H3 (B)	0.009	0.100	0.010	0.011	102.0	92.0
H3 (C)	0.008	0.144	0.013	0.023	78.9	44.0
H4 (B)	0.009	0.138	0.010	0.015	102.0	66.7
H4 (C)	0.007	0.148	0.011	0.023	90.2	42.8

d. Rattendarm

Histon-fraktion	spez. Aktivität (Ci/mol)		Geschwindigkeit der Histonbiosynthese (d^{-1})		mittlere Lebensdauer (d)	
	Leu	Met	Leu	Met	Leu	Met
H2B (B)	0.030	0.119	0.013	0.013	76.7	77.3
H3 (B_1)	0.021	0.133	0.009	0.014	109.6	69.2
H3 (B_2)	0.022	0.135	0.010	0.015	104.6	68.2
H4 (B)	0.027	0.356	0.012	0.039	85.2	25.8

Anhand der in Tabelle 7 gewonnenen Daten über Biosyntheseraten und Lebensdauern einzelner Histonfraktionen in verschiedenen Organen konnten mittlere Lebensdauern für Histone in den Organen angegeben werden.

Tabelle 8 Mittlere Lebensdauern von Histonen in Rattenorganen

	mittlere Lebensdauer (d)			
	Leucin		Methionin	
Organ	min	max	min	max
Leber	47.1	86.6	27.4	64.1
	66.9		45.8	
Milz	26.9	117.5	42.7	95.5
	72.1		69.1	
Niere	77.9	102.0	36.3	118.3
	90.0		77.3	
Darm	78.4	109.7	36.9	83.4
	94.0		60.1	

Als Ergebnis ist festzuhalten, daß die Histonbiosyntheseraten der nicht proliferierenden Organe Leber und Niere niedrig sind. Für die Nierenhistone liegen die Syntheseraten für H3 bei 1.2 % und für H4 bei 1.1 % des Gesamtgehalts an Histonen pro Tag. Dem entspricht eine mittlere Lebensdauer der Histone von rund 80 Tagen.

Gemäß der größeren Stoffwechselleistung und Regenerationsfähigkeit der Leberzelle liegen die Syntheseraten von Leberhistonen mit 1.4 % für H3 und 1.9 % des Gesamtgehalts an Histonen pro Tag für H4 etwas höher. Die mittlere Lebensdauer beträgt hier etwa 50 Tage.

Verglichen mit der von Heine (26 A) für Rattennieren gefundenen DNA-Syntheserate von $1.4 \times 10^{-3}\ d^{-1}$ und unter der Annahme, daß die Histonbiosynthese an die DNA-Synthese gekoppelt ist, muß man schließen, daß eine Histonbiosynthese unabhängig von der DNA-Synthese stattfindet. Dieser DNA-unabhängige Histon-Turnover ist allerdings sehr gering.

Die als proliferierende Gewebe bezeichneten Organe Milz und Darm liegen mit ihren Histonbiosyntheseraten unter den zu erwartenden Werten. Die Syntheseraten müßten zumindest in der Darmschleimhaut höher sein. Es ist anzunehmen, daß bei der Aufarbeitung der Organe zur Gewinnung der Zellkerne die Kleinheit der Rattenmilz und die geringe Menge an Darmschleimhaut, die zur Verfügung standen, dazu geführt haben, daß die Ergebnisse nicht zu verwerten sind. Die Menge an Ausgangsmaterial beeinflußt somit nicht zuletzt die Ergebnisse.

Unter der Annahme, daß die organgebundene Leucinaktivität nur 25 % der Serumaktivität beträgt, liegt die Berechnung der mittleren Lebensdauer der Histone im Bereich der Lebensdauer, die für Methionin berechnet wurde. Daraus kann man nur schließen, daß die beschriebenen Verdünnung des infundierten 'heißen Leucin' durch einen im Organismus bestehenden 'Leucinpool' und durch im Stoffwechsel durch Abbau von Proteinen entstehendes Leucin stattfindet.

Methionin liegt dagegen im Organismus in geringerer Menge vor und wird zu wichtigen Methylierungsreaktionen, wie z.B. die Methylierung von Folsäure, benötigt, so daß in dieser Arbeit angenommen wird, daß es zu 100 % in die Organe aufgenommen wird. Sehr wahrscheinlich liegt aber auch hier die Aufnahme in die Gewebe niedriger. Durch die Annahme kann aber der Verlust an Methionin, der während der Aufarbeitung durch Oxidation zu Methioninsulfoxid entsteht, weitgehend ausgeglichen werden. Zwar wurden zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität des Methionin die beiden Radioaktivitätspeaks (Abb. 19 und Abb. 20) für Methionin und Methioninsulfoxid addiert, was aber sicherlich nicht der Gesamtaktivität für Methionin entspricht. Außerdem liegt, unter der Annahme der 100 %-igen Aufnahme des Methionin in die Organe, die berechnete Lebensdauer für Histone in der Rattenniere im Bereich der von Roos (42) gefundenen Lebensdauer der Histone in der Katzenniere.

3.4 Methylierungsraten der N^{ε}-methylierten Lysine

Methylierbare Lysine finden sich nur in den argininreichen Histonfraktionen H3 und H4 (Tabelle 1). In der Fraktion H3 kommen sämtliche Methylierungsstufen bis hin zum N^{ε}-Trimethyllysin vor, während die Fraktion H4 nur N^{ε}-Monomethyllysin und N^{ε}-Dimethyllysin aufweist. Weiterhin wird in Abb. 19 und Abb.20 deutlich,daß nach einer Dauerinfusionszeit von 130 Minuten alle möglichen methylierbaren Stellen in den Histonfraktionen methyliert sind. Die Fraktion H3

zeigt die höchste Aktivität über dem Dimethyllysin, was der Tatsache entspricht, daß die Menge an Dimethyllysin hier am höchsten ist. Trotzdem zeigt die Berechnung der Methylierungsraten, daß die Neubildungsrate von Monomethyllysin am größten ist. Ebenso verhält sich die Neubildungsrate für Monomethyllysin in der Fraktion H4. Es besteht also kein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit des Vorkommens des methylierten Lysins, dem Ausmaß der Intensität der Markierung und der hinterher tatsächlich vorliegenden Neubildungsrate des einzelnen Methyllysins. Da Monomethyllysin der erste Schritt zur Bildung der methylierten Lysine ist, ist es nur verständlich, wenn seine Neubildungsrate auch am höchsten ist. Bevor die Methylierungsraten der einzelnen Methyllysine bestimmt werden konnte, mußte zunächst wiederum das Problem der Mengenbestimmung in den Histonfraktionen gelöst werden. Auch hier geschah dies mit Hilfe von Mengenverhältnissen aus der Literatur (33). Nach Bildung der Verhältnisse Lys/Lys(Me_1), Lys/Lys(Me_2) und Lys/Lys(Me_3) aus Literaturangaben, war die gemessene Lysinmenge die Grundlage zur Mengenbestimmung von Mono-, Di- und Trimethyllysin.

Die Methylierungsraten der verschiedenen Methyllysine in den Histonfraktionen H3 und H4 der Rattenorgane Leber, Milz, Nieren und Darm wurden jetzt nach den Gleichungen 1 b, c und d aus der gemessenen spezifischen Aktivität der Methyllysine und des Methionins im Serum berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9 Spezifische Radioaktivität methylierter Lysine und daraus nach Gleichung 1 b-d errechnete Methylierungsraten für die Histonfraktionen H3 und H4 von Rattenorganen

Organ	Histon-fraktion	spezifische Radioaktivität (Ci/mol)			Methylierungsraten (d^{-1})		
		Lys(Me_1)	Lys(Me_2)	Lys(Me_3)	Lys k_1	Lys(Me_1) k_2	Lys(Me_2) k_3
Leber	H3 (C)	0.695	0.521	0.674	0.110	0.082	0.107
	H3 (D)	1.033	0.826	0.895	0.100	0.080	0.087
	H4 (C)	1.423	0.546	---	0.227	0.086	---
	H4 (D)	1.237	0.533	---	0.120	0.052	---
Milz	H3 (C)	0.369	0.308	0.364	0.058	0.049	0.058
	H4 (B)	0.841	0.399	---	0.092	0.043	---
	H4 (C)	0.663	0.329	---	0.105	0.052	---
	H4 (D)	1.159	0.648	---	0.113	0.063	---
Niere	H3 (B)	0.207	0.079	0.080	0.023	0.009	0.009
	H3 (C)	0.820	0.300	0.525	0.130	0.047	0.083
	H4 (B)	1.344	0.335	---	0.147	0.036	---
	H4 (C)	1.146	0.288	---	0.182	0.045	---
Darm	H3 (B_1)	0.511	0.264	0.258	0.056	0.029	0.028
	H3 (B_2)	0.517	0.268	0.262	0.056	0.029	0.028
	H4 (B)	0.416	0.187	---	0.045	0.020	---

Für alle Histonfraktionen ist in den Organen die Geschwindigkeit der Monomethylierung größer als die Geschwindigkeit der Di- und Trimethyllysinbildung.
Die Methylierungskonstante k_1 gibt an, welcher Anteil von $Lys(Me_1)$ pro Zeiteinheit durch die Methylierung von Lysin neu gebildet wird. Analoges gilt für k_2 und k_3. Es wird also nicht die gesamte Neubildung von $Lys(Me_1)$ angegeben. Diese ist wesentlich höher, wie an einem Schema der Histonmethylierung gezeigt werden kann:

$$\text{Lysin} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} Lys(Me_1) \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} Lys(Me_2) \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} Lys(Me_3)$$

Nur für die Endstufen der Methylierung in den Histonfraktionen, also für die Trimethylierung der Fraktion H3 und die Dimethylierung der Fraktion H4 stimmt die Methylierungskonstante mit der tatsächlichen Neubildungsrate überein. In diesen Fällen ist die Methylierungsrate gleich dem Turnover der Methylgruppen.
Die Rate der Neubildung von N^{ε}-Monomethyllysin (K_M) eines bestimmten Histons kann auf folgendem Weg berechnet werden:

$$K_M \times Lys(Me_1) = k_1 \times Lys(Me_1) + k_{-2} \times Lys(Me_2)$$

$$K_M = k_1 + k_{-2} \frac{Lys(Me_2)}{Lys(Me_1)} \qquad \text{(Gleichung 2a)}$$

K_M, K_D Neubildungsrate (d^{-1}) für $Lys(Me_1)$ bzw $Lys(Me_2)$

k_1, k_2, k_3 Methylierungskonstante (d^{-1}) für die Bildung von N^{ε}-Mono-, Di- und Trimethyllysin aus den jeweils um eins weniger methylierten Vorstufen.

k_{-1}, k_{-2}, k_{-3} Demethylierungskonstante (d^{-1}) für die Demethylierung von N^{ε}-Mono-, Di- und Trimethyllysin.

$Lys(Me_1)$ Gehalt des Histons an den jeweiligen

$Lys(Me_2)$, $Lys(Me_3)$ Methyllysinen in Mol-Prozent.

Im steady-state ist $k_1 = k_{-1}$.

Für die Neubildung von N^{ε}-Dimethyllysin gilt analog:

$$K_D = k_2 + k_{-3} \frac{Lys(Me_3)}{Lys(Me_2)} \qquad \text{(Gleichung 2b)}$$

In der folgenden Tabelle sind die nach Gleichung 2a und 2b mit Hilfe von mittleren Methylierungskonstanten für die Fraktionen H3 und H4 berechneten tatsächlichen Neubildungsraten für methylierte Lysine zusammengestellt. Die Raten für die Änderung des Methylierungsgrades sind danach für die einzelnen Organe im Schnitt 3 bis 20 mal größer als die Rate der Histonbiosynthese (siehe auch Abb. 23)

Organ	Histon-fraktion	Neubildungsrate (d^{-1})			Histonbio-syntheserate	relative Neubildungsraten		
		$Lys(Me_1)$ K_M	$Lys(Me_2)$ K_D	$Lys(Me_3)$ K_T	(d^{-1}) K_H	$Lys(Me_1)$	$Lys(Me_2)$	$Lys(Me_3)$
Leber	H3	0.264	0.124	0.097	0.014	19	9	7
	H4	0.632	0.069	---	0.019	33	4	-
Milz	H3	0.147	0.075	0.058	0.016	9	5	4
	H4	0.329	0.053	---	0.009	38	6	-
Niere	H3	0.136	0.046	0.046	0.012	11	4	4
	H4	0.341	0.041	---	0.011	31	4	-
Darm	H3	0.107	0.040	0.028	0.010	11	4	3
	H4	0.112	0.020	---	0.039	3	0.5	-

Tabelle 10 Neubildungsraten für methylierte Lysine der Histone aus den Rattenorganen Leber, Milz, Nieren und Darm.
Dauerinfusionsversuch mit ^{3}H-Methionin und ^{3}H-Leucin.

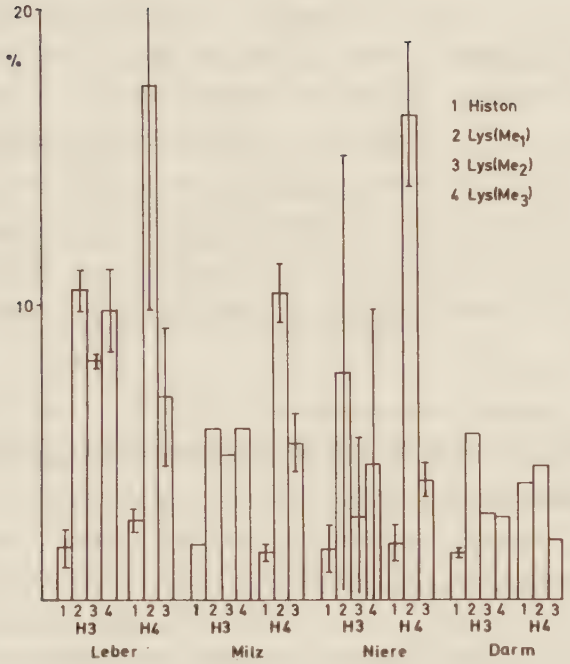

Abb. 23 Gegenüberstellung der Neubildungsraten von Rattenhistonen und der darin vorkommenden verschiedenen Methyllysine.
Aufgetragen ist die tägliche Neubildung in Prozent des Gesamtgehalts.

4. DISKUSSION

Nur unter der Voraussetzung, daß eine Histonbiosynthese und Histonmethylierung unabhängig von der DNA-Synthese besteht, kann man annehmen, daß die Histonmethylierung eine Rolle bei der Regulation der Genaktivität spielt. Die Histonbiosynthese- und Histonmethylierungsraten müssen dementsprechend die DNA-Syntheseraten übertreffen, wobei die Methylierungsraten wiederum größer als die Syntheseraten sein müssen, um eine Regulation, z.B.durch Konformationsänderungen am Chromatin, zu bewirken.

4.1 Histon-Turnover in den Rattenorganen Leber, Nieren, Milz und Darm

4.1.1 Beurteilung der Methoden

Geeignete Testsysteme zur Untersuchung von Histonbiosyntheseraten und -methylierung sind nicht oder wenig proliferierende Organe wie Leber und Nieren. Die Verabreichung von radioaktiv markiertem ^{3}H-Methionin und ^{3}H-Leucin durch Dauerinfusion führt zu quasi konstanten spezifischen Radioaktivitäten der Vorläufer im Serum. Zur Berechnung der Histonsynthese- und methylierungsraten ist die Kenntnis der spezifischen Radioaktivität des freien Methionin und Leucin im Gewebe notwendig. Da diese spezifische Aktivität in den Geweben nicht direkt bestimmt werden konnte, wurde die Plasmaaktivität der

Vorläufer zugrundegelegt und unter Beachtung der speziellen Stoffwechselaktivitäten der Aminosäuren Methionin und Leucin die spezifische Radioaktivität des freien Methionin im Gewebe zu 100 % und die spezifische Radioaktivität des freien Leucin im Gewebe zu 25 % der Serumaktivität angenommen.

Diese Differenz ist darin begründet, daß L-Methionin im Gewebe nur in geringer Menge vorkommt, die Verdünnung durch 'kaltes Methionin' entsprechend gering ist und darin, daß es in Form seines Folgeprodukts S-Adenosylmethionin an wichtigen Methylierungsprozessen teilnimmt.

Leucin wurde dagegen als DL-Leucin infundiert. Die D-Form des Leucin kann im Stoffwechsel nicht direkt verwertet werden und wird nur verzögert in die Organe aufgenommen. Außerdem ist die Verdünnung des 'heißen Leucin' durch große Mengen 'kaltes Leucin', das im Gewebe vorliegt oder bei Abbau von Proteinen entsteht, groß.

Die Güte der Histonisolierung wurde durch Injektion von radioaktiv markiertem ^{3}H-Tryptophan überprüft. Dabei zeigte sich, daß die isolierten Proteine kein Tryptophan enthielten. Deshalb konnte man annehmen, daß es sich bei den isolierten Proteinen um Histone handelt, nachdem Hnilica (28) nachgewiesen hat, daß Histone kein Tryptophan enthalten.

Größere Schwankungen in den berechneten Histonbiosyntheseraten von Tier zu Tier und Fraktion zu Fraktion ergaben sich nicht zuletzt durch die Aufarbeitung der Histone mittels Gelelektrophorese und Elution. So gut die Auftrennung der Histone in ihre Hauptfraktionen auch gelingt, die Gewinnung des 'reinen' Proteines aus den Gelen bereitet Schwierigkeiten.

Die Überlagerung der zu bestimmenden Aminosäuren durch basische Spaltprodukte des Polyacrylamid führte zu fast unlösbaren Problemen bei der Auswertung der Aminosäureanalysen. Auch andere Autoren (Brooks 10A, Brown 10B) beschreiben die Verunreinigung der eluierten Proteine mit Spaltprodukten des Polyacrylamid. Der Versuch diese Verunreinigungen nach der Elution wieder zu beseitigen ist bisher aber noch nicht befriedigend gelungen. Diese Schwierigkeiten einer an sich eleganten Methode gilt es in Zukunft zu eliminieren.

4.1.2 Histon-'Nettobiosynthese' in den untersuchten Rattenorganen

Eine solche Histon-'Nettobiosynthese konnte in der vorliegenden Arbeit für die Organe Leber und Nieren nachgewiesen werden. Die Histonsynthese liegt für diese Organe mit 1 - 2 % der Gesamtmenge an Histonen täglich etwa 10 - 20 mal höher als die DNA-Syntheserate von 0.14 % für die Rattennieren in der Arbeit von Heine (26A). An der mittleren Lebensdauer der Histone von 50 - 80 Tagen sieht man allerdings, daß der Turnover dieser Rattenhistone niedrig ist. Die untersuchten proliferierenden Gewebe wie Darmschleimhaut und Milz zeigten nicht das zu erwartende Ergebnis. Die geringe Menge an Organmaterial, das pro Tier zur Verfügung stand, und sich daraus ergebende Verluste bei der Aufarbeitung der Organe tragen wohl zum Nichtgelingen des Nachweises einer Histonbiosynthese in glaubhafter Höhe bei. Vor allem in der Darmschleimhaut, die sich in wenigen Tagen

regeneriert, liegen die gemessenen Werte viel zu hoch. Um einen Eindruck von den Organgrößen vor der Aufarbeitung zu bekommen, seien hier kurz die durchschnittlichen Gewichte von Leber, Nieren, Milz und Darmschleimhaut genannt. Der Leber, die mit ca. 10 g an der Spitze lag, folgten die Nieren mit ca. 5 g. Milz und Darmschleimhaut brachten es dagegen nur auf jeweils 1 g.

4.2 Methylgruppen-Turnover in den Histonen der Rattenorgane Leber, Nieren, Milz und Darm

Die N^{ε}-Methylierung von Histonen am Lysinrest ist eine spezifische enzymatische Reaktion, die durch ein Enzym Methylase III durchgeführt wird. Andere Methylierungsreaktionen laufen an der Guanidinogruppe von Argininresten (37) mit Hilfe der Proteinmethylase I und an den freien Carboxylgruppen der Asparaginsäure (38) mit Hilfe der Proteinmethylase II ab. Das Enzym N^{ε}-Alkyllinase demethyliert peptidisch gebundene Methyllysine, wobei die Methylgruppe als Formaldehyd freigesetzt wird.

Für die argininreichen Histone H3 und H4 der Rattenorgane Leber, Nieren und Milz konnte ein Turnover lysingebundener Methylgruppen nachgewiesen werden, der praktisch nicht durch neusynthetisierte Histone überlagert wird. Das Ergebnis in der Milz muß man kritisch betrachten, da die berechneten Histonbiosyntheseraten für dieses doch relativ stark proliferierende Organ zu niedrig liegen. Für die Organe Leber und Nieren als nicht proliferierende Organe ist die meta-

bolische Stabilität des Histongerüsts sehr viel größer als die der N^{ε}-Methylgruppen, wie aus Tabelle 10 und Abb. 23 zu entnehmen ist.

Für die Histone der Darmschleimhaut läßt sich auch hier aus den beschriebenen Gründen kein Ergebnis angeben. Inwieweit am Darm ein Vergleich zwischen Histonbiosynthese und Histonmethylierung erlaubt ist, ist bei der Differenz zwischen Regenerationszeit der Darmschleimhaut und der gemessenen Halbwertszeit der Histone ungewiss. Eins zeigt der Versuch allerdings deutlich: die Methylierungsraten der Darmhistone liegen nur unwesentlich höher als die Histonbiosyntheseraten. Die Geschwindigkeiten beider Vorgänge liegen also beim Darm in gleicher Größenordnung, was mit Versuchen von Byvoet (11) übereinstimmt, der an rasch proliferierenden Novikoff-Hepatomen der Ratte nach Injektion von L-Methionin(methyl-^{14}C) keinen Methylgruppen-Turnover nachweisen konnte. Er konnte allerdings eine hohe Histonbiosyntheserate, was auf eine starke Proliferation hinweist, nachweisen, was in dieser Arbeit für die Histone der Darmschleimhaut nicht gelang. Ähnliche Ergebnisse erzielten Duerre und Lee (18). Sie markierten Hirnhistone 12 Tage alter Ratten durch gleichzeitige Gabe von L-Methionin(methyl-^{14}C) und L-Lysin(4,5-^{3}H) und verfolgten das ^{3}H/^{14}C-Radioaktivitätsverhältnis über 280 Tage. Der Turnover der ^{14}C-markierten Methylgruppen unterschied sich nicht wesentlich von dem der ^{3}H-markierten Lysinreste. Auch hier wurden sicherlich fast ausschließlich Methylierungsstellen in neusynthetisierten Histonen markiert.

Einzige Ausnahme sind die Versuche von Borun et al. (5). Durch Untersuchung der Methylierungsraten an synchronisierten HeLa S-3 Zellkulturen mit L-Methionin(methyl-^{14}C) konnte gezeigt werden, daß während eines Zyklus 1/3 aller Methylgruppen ausgetauscht wurde.

4.3 Funktionelle Bedeutung der Histonmethylierung

Es wurde vermutet, daß durch die Methylierung die Proteine vor dem Abbau durch intrazelluläre Proteasen geschützt werden (39). Neuere Untersuchungen der gleichen Autoren (Paik und Kim, 40) an methylierter pankreatischer RNAse und Histonen ergaben, daß die Methylierung der Histone ohne Einfluß auf ihren Abbau durch Proteasen ist. Weiterhin wurde angenommen, daß die Methylgruppensubstitution durch Veränderung der Basizität der Methyllysine Auswirkungen auf die elelktrostatische Bindung der Histone andie DNA hat. Der Vergleich der pK_b-Werte von mono- bis trimethyliertem Ammoniak führte zu dieser Annahme (27). Bis zum Dimethylamin nimmt der pK_b-Wert auch ab, das heißt die Basizität zu. Der Übergang zum Trimethylamin ist dagegen mit einem Anstieg des pK_b-Wertes verbunden. Es ist also nicht so, daß die Methylsubstitution in jedem Fall die Basizität des Histons verstärkt. Unterschiede im Protonisierungsgrad treten zudem erst bei einem pH-Wert von 10 bis 11 auf. Der Methylierungsgrad kann somit keinen Einfluß auf die elektrostatische Wechselwirkung der Histone mit der DNA haben.

Zum Schluß bleibt noch in Erwägung zu ziehen, welchen Einfluß die Methylierung auf die räumlichen Gegebenheiten in der Umgebung der Methylierungsstellen hat. Diese liegen bei den Fraktionen H3 und H4 am N-terminalen Ende, die mit der DNA interagieren (41). Die Einführung voluminöser Methylgruppen am Lysin könnte die räumlichen Verhältnisse derart umgestalten, daß Auswirkungen auf die Konformation des DNA-Histon-Komplexes zu erwarten sind, die die Zugänglichkeit bestimmter Genorte, z.B. für RNA-Polymerasen, beeinflussen.

Endgültige Aussagen über die biologische Bedeutung der Histonmethylierung sind im Moment, auch in Anbetracht der noch spärlichen Untersuchungen über dieses Thema, noch nicht zu machen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Den Histonen, die im Zellkern eng mit der DNA verknüpft sind, wird eine Stützfunktion der DNA-spirale und als weiteres wichtiges Merkmal eine Regulationsfunktion der Genaktivität zugeschrieben. Diese Regulationsfunktion läßt sich durch drei verschiedenen Modifikationen am Histonmolekül erreichen: durch Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung. Die hier untersuchte Methylierung erfolgt an Lysinresten der argininreichen Histone H3 und H4 in ε-Stellung am Stickstoffatom. H4 enthält N^{ε}-Monomethyllysin und N^{ε}-Dimethyllysin, wohingegen H3 bis zum N^{ε}-Trimethyllysin methyliert wird.

Die Versuche wurden an Ratten durchgeführt. Zunächst wurde überprüft, ob die aus den Zellkernen der Organe Leber, Milz, Nieren und Darmschleimhaut extrahierten Proteine tatsächlich Histone sind. Dies geschah, indem zwei Ratten L-Tryptophan(2,3-^{3}H) intraperitoneal injiziert wurde. Nach einer Überlebenszeit von 2 Stunden wurden die Organe entnommen, die Histone extrahiert und ihr Gehalt an ^{3}H-Tryptophan untersucht. Es fand sich dabei, wie Hnilica (28) für Histone beschrieben hat, kein radioaktives Tryptophan in den Proteinen, was darauf schließen läßt, daß nur Histone aus den Zellkernen extrahiert wurden.

Die eigentlichen Untersuchungen von Histonbiosynthese- und methylierungsraten fand an 5 weiteren Ratten statt, denen mittels Dauerinfusion L-Methionin(methyl-^{3}H) und DL-Leu-

cin(4,5-$^{3}H_2$) über 130 Minuten verabreicht wurde. Während der Versuchszeit wurden Blutproben entnommen, um den Verlauf der spezifischen Radioaktivität der Vorläufer Methionin und Leucin im Serum zu bestimmen, deren Kenntnis eine Voraussetzung für die Berechnung von Histonbiosynthese und -methylierungsraten ist.

Nach Entnahme der Organe, Isolierung der Zellkerne und Extraktion der Histone erfolgte die Auftrennung der Histone in ihre Fraktionen H1, H3, H2B, H2A und H4 mittels Gelelektrophorese. Neuere Verfahren der retrograden Gelelektrophorese bzw. Elution wurden benutzt, um speziell die Banden H3 und H4, die Methyllysine tragen, aus den Gelen herauszulösen und als 'Reinproteine' zu erhalten. Nach der sich anschließenden Hydrolyse und Aminosäurenanalyse mußten allerdings mit Hilfe von Literaturangaben die in Punkt 2.2.2.9 beschriebenen Auswertungsschwierigkeiten, wie die Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid sowie die Überlagerung von Leucin durch Pyridoxal und die Überlagerung der basischen Methyllysine durch basische Spaltprodukte des Polyacrylamid, beseitigt werden.

Die auswertbaren Messungen und Berechnungen ergaben, daß ca. 1 - 2 % der vorhandenen Histone in den Organen Leber und Nieren täglich durch Neusynthese ersetzt werden. Es fand sich also, verglichen mit der von Heine (26A) gefundenen DNA-Syntheserate von 1.4×10^{-3} d^{-1} für Rattennieren, ein echter Turnover von Histonen, der unabhängig von der DNA-replikation während der Zellteilung ist.

Für die untersuchten proliferierenden Organe Milz und Darm-

schleimhaut konnten keine verläßlichen Angaben über Histon-biosynthese und -methylierungsraten gemacht werden. Die Menge an Organausgangsmaterial pro Tier von ca. 1 g Darmschleimhaut bzw. 1 g Milz reichten einfach bei der Aufarbeitung der Organe nicht aus, um genügend Histone zu isolieren. Die Verluste, die während der gesamten Aufarbeitung bis hin zu den Aminosäureanalysen entstanden, waren, um verwertbare Ergebnisse zu erzielen, zu groß.

In den nicht proliferierenden Organen Leber und Nieren zeigte sich, daß die Neubildungsrate histongebundener Methylgruppen die Histonbiosyntheserate nochmal um den Faktor 3 bis 30 übertrifft. Es ist demnach durchaus denkbar, daß bei diesem raschen Methylgruppen-Turnover die Methylierung von Histonen auch eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Genaktivität spielt. Endgültige Aussagen über dieses Thema sind, wie schon gesagt, zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Allfrey, V.G.
Functional and metabolic aspects of DNA-associated proteins.
In 'Histones and Nucleohistones'. (ed. by D.M.P. Phillips)
Plenum Press, London-New York, (1971), 241-294

2. Allfrey, V. G., Faulkner, R., Mirsky, A. E.
Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA-synthesis.
Proc. Nat. Accad. Sci. US., 51 (1964), 786-794

3. Baldwin, J. P., Boseley, P. G., Bradbury, E. M.
The subunit structure of the eucaryotic chromosome.
Nature, 253 (1975), 245-249

4. Blackburn, S.
Sample preparations and hydrolytic methods.
In 'Amino Acid Determination'.
(ed. by S. Blackburn)
Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, (1978)

5. Borun, Th. W., Pearson, D., Paik, W. K.
Studies of histone methylation during the Hela S-3 cell cycle.
J. Biol. Chem., 247 (1972), 4288-4298

6. Borun, Th.W., Ajiro, K., Zweidler, A., Dolby, Th. W., Stephens, R. E.
Studies of messenger-RNA.
J. Biol. Chem., 252 (1976), AB

7. Braatz, J. A., McIntire, K. R.
A rapid and efficient method for the isolation of protein from polyacrylamid-gels.
Prep. Biochem., 7 (1977), 495-509

8. Breindl, M., Gallwitz, D.
Identification of histone messenger-RNA in Hela-cells.
J. Mol. Biol., 67 (1972), 397-406

9. Burdon, R. H.
Enzymic modification of chromosomal macromolecules. I. DNA and proteinmethylation in mouse tumor cell chromatin.
Biochim. Biophys. Acta, 232 (1971), 359-370

10A. Brooks, K. P., Sander, E. G.
Preparative polyacrylamid gel electrophoresis: Removal of polyacrylate from proteins.
Anal. Biochem., 107 (1980), 182-186

10B. Brown, W. E., Howard, G. C.
Amino acid composition of proteins eluted from polyacrylamid-gels: Background considerations
Anal. Biochem., 101 (1980), 294-298

10. Byvoet, P., Shepherd, G. R., Hardin, J. M., Noland, B. J.
The distribution and turnover of labeled methyl in histone fraction of cultured mammalian cells.
Arch. Biochem. Biophys., 148 (1972), 558-567

11. Byvoet, P.
In vivo turnover and distribution of radio-N-methyl in arginin-rich histones from rat tissues.
Arch. Biochem. Biophys., 152 (1972), 887-888

12. Chauveau, J., Moule, Y., Roullier, Ch.
Isolation of pure and unaltered liver nuclei, morphology and biochemical composition.
Exp. Cell Res., 11 (1956), 317

13. Comb, D. G., Sarkar, N., Pinzino, C. J.
The methylation of lysin residues in protein.
J. Biol. Chem., 241 (1966), 1857-1862

14. D' Anna, J. A., Isenberg, J.
Interaction of renatured histones f_3 and f_{2a1}.
Biochem. Biophys. Res. Com., 61 (1974), 343-347

15. De Lange, R. J., Fambrough, D. M., Smith, E. L., Bonner, J.
Calf and pea histone IV. III. Complete sequence of pea seadling histone IV. Comparison with the homologons of calf-thymus histone.
J. Biol. Chem., 244 (1969), 5669-5679

16. De Lange, R. J., Hooper, J. A., Smith, E. L.
Histone III. 3. Sequence studies on the cyanogen bromide peptides; complete amino acid sequence of calf-thymus histone III.
J. Biol. Chem., 248 (1973), 3261-3274

17. De Lange, R. J., Smith, E. L.
The structure of histones.
Acc. Chem. Res., 5 (1972), 368-373

18. Duerre, J. A., Lee, C. T.
In vivo methylation and turnover of rat brain histones.
J. Neurochem., 23 (1974), 541-547

19. Duerre, J. A., Chakrabarty, S.
Methylated basic amino acid composition of histones from various organs from rat.
J. Biol. Chem., 244 (1969), 5847-5952

20. Deimel, M., Maurer, W.
Konzentration und Austauschrate des freien Methionins in Muskel und Leber der Ratte.
Biochem. Zeitschrift, 334 (1961), 462-472

21. Farooqui, J., Kim, S., Paik, W. K.
In vivo studies on yeast cytochrome c methylation in relation to protein synthesis.
J. Biol. Chem., 255 (1980), 4468-4473

22. Fischbach, W.
Zur unterschiedlichen Inkorporation von D- und L-Aminosäuren in Serum-, Nieren-, und Leberprotein der Ratte.
Inaugural-Dissertation, Würzburg 1979

23. Gan, J. C., Jeffay, H.
Origin and metabolism of the intracellular amino acid pools in rat liver and muscle.
Biochem. Biophys. Acta, 148 (1967), 448-459

24. Gan, J. C., Jeffay, H.
The kinetics of transfer of plasma amino acids to tissues and the turnover rates of liver and muscle proteins.
Biochem. Biophys. Acta, 252 (1971), 125-135

25. Hamana, K., Iwai, K.
Effects of Triton X-100 on gel electrophoresis and gel chromatography of histones. Possible binding to helical regions.
J. Biochem., 79 (1976), 125

26. Heil, A., Zillig, W.
FEBS-Letters, 11 (1970), 165-168

26A. Heine, W. D.
Das kompensatorische Nierenwachstum und seine Regulation.
Habilitationsschrift, Würzburg 1973

27. Hnilica, L. S., McClure, M. E., Spelsberg, T. C.
Histone biosynthesis and cell cycle.
In 'Histones and Nucleohistones'
(ed. by D.M.P. Phillips)
Plenum Press, London-New York, (1971), 187-240

28. Hnilica, L. S.
Chemical properties of histones.
In 'The structure and biological functions of histones'. (ed. by Robert C. Weasz, Ph.D)
CRC Press, Cleveland, Ohio, (1972), 5

29. Honda, B. M., Dixon, H. G., Candido, P. M.
Sites of in vivo methylation in developing trout testis.
J. Biol. Chem., 250 (1975), 8681-8685

30. Kornberg, R. D.
Chromatin structure: Oligomers of the histones.
Science, 184 (1974), 868-871

31. Kornberg, R. D., Thomas, J. V.
Chromatin structure: A repeating unit of histone and DNA.
Science, 184 (1974), 865-868

32. Lange, H. W., Lustenberger, N., Hempel, K.
Flüssigkeits-Chromatographie von Pyridoxal-Aminosäuren. Neues Verfahren der automatisierten Analyse von Aminosäuren im Pikomol-Bereich (10^{-12} Mol).
Z. Anal. Chem., 261 (1972), 337-342

33. Lange, H. W.
N^{ε}-Trimethyllysin und andere methylierte Lysine in Histonen.
Inaugural-Dissertation, Köln 1968

34. Lee, H. W., Paik, W. K.
Histone methylation during hepatic regeneration in rat.
Biochim. Biophys. Acta, 277 (1972), 107-116

35. Ohba, Y., Hayashi, K., Nakagawa, Y., Yamaguchi, Z.
Metabolic activities of histones in rat liver and spleen.
Eur. J. Biochem., 56 (1975), 343-352

36. Paik, W. K., Kim, S.
Solubilisation and partial purification of protein methylase III from calf-thymus nuclei.
J. Biol. Chem., 245 (1970), 6010-6015

37. Paik, W. K., Kim, S.
Proteinmethylase I. Purification and properties of the enzyme.
J. Biol. Chem., 243 (1968), 2108-2114

38. Paik, W. K., Kim, S.
Purification and properties of proteinmethylase II.
J. Biol. Chem., 245 (1970), 6015-6020

39. Paik, W. K., Kim, S.
Protein methylation.
Science, 174 (1971), 114-119

40. Paik, W. K., Kim, S.
Effect of methylation on susceptibility of protein to proteolytic enzyms.
Biochem., 11 (1972), 2589-2593

41. Phillips, D. M. P.
The primary structure of histones and protamines.
In 'Histones and Nucleohistones'. (ed. by D.M.P. Phillips)
Plenum Press, London-New York, (1971), 47-84

42. Roos, G.
Metabolische Stabilität von DNA, Histonen und histongebundenen Methylgruppen. Versuche mit ^{3}H-markiertem Methionin an der Katzenniere.
Inaugural-Dissertation, Würzburg 1978

43. Severin, E. S.
Mechanism of action and regulatory properties of histones.
Tenth international congress of biochemistry, Hamburg 1976

44. Stöcker, W. A.
Über eine Methode zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität und der biologischen Halbwertszeit des Methylgruppendonators S-Adenosylmethionin unter in vivo Bedingungen.
Inaugural-Dissertation, Würzburg 1976

45. Thomas, G.
Methylgruppen in Histonen: Zeitpunkt und Kinetik ihres Einbaus sowie ihre Stabilität.
Dissertationsschrift, Würzburg 1974

46. Thomas, G., Lange, H. W., Hempel, K.
Relative Stabilität lysingebundener Methylgruppen bei den argininreichen Histonen und ihren Unterfraktionen von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen in vitro.
Z. Physiol. Chem., 353 (1972), 1423-1428

47. Tidwell, T., Allfrey, V. G., Mirsky, A. E.
The methylation of histones during regeneration of rat liver.
J. Biol. Chem., 243 (1968), 707-715

7. ABKÜRZUNGEN

A_1- Protein	Basisches Myelinprotein
^3H- Methionin	L-Methionin(methyl-^3H)
^3H- Leucin	DL-Leucin(4,5-$^3H_2$)
Lys(Me_1)	N^{ε}-Monomethyllysin
Lys(Me_2)	N^{ε}-Dimethyllysin
Lys(Me_3)	N^{ε}-Trimethyllysin
s	spezifische Radioaktivität

$$\text{z.B. } {}^{s}\text{Met} = \frac{^3\text{H-Aktivität des Methionin}}{\text{Methioninmenge}}$$

$${}^{s}\text{Met} = \frac{\text{Ci}}{\text{mol}}$$

Herrn Prof. Dr. A. M. Kellerer danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Strahlenkunde.

Herrn Prof. Dr. Dr. K. Hempel danke ich besonders herzlich für die Überlassung des Themas und für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Wolpert für die Tierpräparation, sowie bei Frau Monika Grünbeck, Frau Christa Eichler, Frl. Monika Pröstler und Frau Gertrud Ullrich für ihre technische Assistenz bedanken.

L E B E N S L A U F

Am 7. August 1952 wurde ich, Norbert Knöck, als Sohn des Diplom-Ingenieurs Heinrich Knöck und seiner Frau Paula, geb. Klapprott, in Krefeld-Uerdingen geboren.

Von 1959 bis 1964 besuchte ich die Volksschulen von Oberbruch, Heinsberg und Erlenbach/Main. Anschließend wechselte ich an das Johannes-Butzbach-Gymnasium in Miltenberg, wo ich 1973 das Abitur bestand.

Bis April 1974 leistete ich einen Teil des Wehrdienstes ab und nahm im Sommersemester 1974 das Medizinstudium auf.

Jeweils im Wintersemester 1976, 1977, 1979 und 1980 bestand ich das Physikum und den ersten, zweiten und dritten Teil der Ärztlichen Prüfung.

Die Approbation als Arzt wurde mir am 19. Mai 1980 erteilt.

Seit 1. Juni 1980 bin ich als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Anaesthesiologie der Universität Würzburg beschäftigt.

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden von mir am Institut für Medizinische Strahlenkunde im Zeitraum vom Sommersemester 1977 bis zum Frühjahr 1981 durchgeführt.

Norbert Knöck